

Aus dem Institut für Tierernährung und dem Veterinär-Anatomischen Institut
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich
(Direktoren: Prof. Dr. M. Wanner und Prof. Dr. H. Geyer)

Arbeit unter der Leitung von
Dr. A. Liesegang und
Prof. Dr. A. Boos

Immunhistochemische Untersuchungen zur Verteilung von Vitamin D-Rezeptoren im Darm von Schaf und Ziege

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Vetsuisse-Fakultät
Universität Zürich

vorgelegt von

Katharina Riner

Tierärztin von Dulliken SO

genehmigt auf Antrag von

Prof. Dr. A. Boos, Referent
Prof. Dr. M. Wanner, Korreferent

Zürich 2006

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	V
1 Zusammenfassung	7
2 Abstract	8
3 Einleitung	9
4 Literaturübersicht	11
4.1 Topographie und Morphologie des Darmes beim kleinen Wiederkäuer	11
4.2 Vitamin D	13
4.2.1 Begriffsdefinition von Vitamin D	13
4.2.2 Stoffwechsel von Vitamin D	14
4.2.2.1 Zufuhr mit der Nahrung	14
4.2.2.2 Eigensynthese	14
4.2.2.3 Physiologische Wirkung von Vitamin D	15
4.3 Kalzium-Stoffwechsel und Vitamin D	15
4.3.1 Kalzium-Absorption im Darm	15
4.3.2 Weitere Wirkungsorte von Vitamin D	17
4.3.3 Verteilung des Kalziums im Körper	17
4.3.4 Zusammenspiel zwischen Vitamin D und anderen Hormonen bei der Kalzium-Homöostase	18
4.3.4.1 Parathormon	19
4.3.4.2 Calcitonin	20
4.4 Hypokalzämie	21
4.4.1 Definition und Vorkommen, prädisponierende Faktoren	21
4.4.2 Pathogenese der Hypokalzämie bei den verschiedenen Wiederkäuern	21
4.4.2.1 Milchkuh	21
4.4.2.2 Schaf	23
4.4.2.3 Ziege	23
4.4.3 Pathophysiologie	24
4.4.4 Klinische Anzeichen und Folgeerkrankungen	24
4.4.4.1 Milchkuh	24
4.4.4.2 Schaf	26
4.4.4.3 Ziege	26
4.4.5 Differentialdiagnosen	27
4.4.6 Klinische Pathologie	27
4.4.7 Behandlung und Prävention	28
4.4.8 Bedeutung von Vitamin D und von dessen Rezeptor bei der Hypokalzämie	31
4.5 Vitamin D-Rezeptor	32
4.5.1 Lokalisation, Molekulargewicht und Vorkommen	32
4.5.2 Struktur und Funktion des Vitamin D-Rezeptors	33

4.5.3	Bisherige Untersuchungen zum Vorkommen und zur Verteilung von Vitamin D-Rezeptoren bei verschiedenen Tierarten und beim Menschen	35
4.5.3.1	Vitamin D-Rezeptoren beim Huhn	35
4.5.3.2	Vitamin D-Rezeptoren beim Menschen	35
4.5.3.3	Vitamin D-Rezeptoren beim Schwein	36
4.5.3.4	Vitamin D-Rezeptoren bei der Ratte	37
4.5.3.5	Vitamin D-Rezeptoren beim Rind	38
5	Tiere, Material und Methoden	39
5.1	Probengewinnung	39
5.1.1	Probeentnahme bei Schlachttieren	39
5.1.2	Darmbiopsieentnahme	40
5.2	Probenaufarbeitung	40
5.3	Histologische und immunhistochemische Methoden	41
5.3.1	Übersichtsfärbung	41
5.3.2	Immunhistochemischer Nachweis	41
5.3.2.1	Grundprinzipien der Immunhistochemie	41
5.3.2.2	Vitamin D-Rezeptornachweismethode	43
5.4	Auswertung der durchgeführten Reaktionen	43
5.4.1	Sichtung des Probenaufkommens und Auswahl für den immunhistochemischen Nachweis	43
5.4.2	Semiquantitative Ermittlung des Vitamin D-Rezeptorgehalts	44
5.5	Mikroskopische Ausrüstung und photographische Befund-dokumentation	45
5.6	Statistische Auswertung	45
6	Ergebnisse	46
6.1	Immunhistochemischer Nachweis des Vitamin D-Rezeptors	46
6.1.1	Nachweis von Vitamin D-Rezeptoren im Darm von Schlachtschafen	46
6.1.1.1	Einfluss des Alters auf die Menge an Vitamin-D-Rezeptoren	46
6.1.1.2	Histomorphologische Beschreibung	46
6.1.1.3	Die einzelnen Darmabschnitte im Vergleich	51
6.1.1.4	Die einzelnen Darmabschnitte im Vergleich unter Einbindung der unterschiedlichen Schleimhautstellen	52
6.1.2	Nachweis von Vitamin D-Rezeptoren im Darm von Schlachtziegen	54
6.1.2.1	Einfluss des Alters auf die Anzahl Vitamin D-Rezeptoren	54
6.1.2.2	Histomorphologische Beschreibung	54
6.1.2.3	Die einzelnen Darmabschnitte im Vergleich	56
6.1.2.4	Die einzelnen Darmabschnitte im Vergleich unter Einbindung der unterschiedlichen Schleimhautstellen	57
6.1.2.5	Unterschiede zwischen Schlachtschafen und Schlachtziegen	59
6.1.3	Nachweis von Vitamin D-Rezeptoren in Colonbiopsien bei ostfriesischen Milchschaafen und Saanenziegen	60
6.1.3.1	Histomorphologische Beschreibung	61
6.1.3.2	Signifikante Unterschiede im Verlaufe der Laktation	62

6.1.3.3	Signifikante Unterschiede in den einzelnen Drüsenabschnitten	66
7	Diskussion	69
8	Ausblick	75
9	Literaturverzeichnis	76
10	Anhang	81
11	Danksagung	92
	Lebenslauf	93

Abkürzungen

µg	Mikrogramm
µmol	Mikromol
1,25-(OH) ₂ D	1,25-Dihydroxycholecalciferol
25-(OH)D	25-Hydroxycholecalciferol
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BG	Basale Drüsenabschnitte
C	Kohlenstoffatom
Ca	Kalzium
CC	Cäkum
CD	Colon descendens
cDNA	Copy-Desoxyribonucleinsäure
Da	Dalton
DA	Duodenum ascendens
DBP	Vit D bindendes Protein Calbindin
DD	Duodenum descendens
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
fmol	femtomol
HE	Hämalaun-Eosin
HWZ	Halbwertszeit
IE	Internationale Einheiten
IG	Intermediäre Drüsenabschnitte
IL	Ileum
IRS	Immunreaktiver Score
JE	Jejunum
kDa	Kilo-Dalton
mmol	Milimol
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
Na ⁺	Natrium-Ion
P	Phosphor
p.p.	post partum
pg	Picogramm
pI	Isoelektrischer Punkt
PTH	Parathormon

RT-PCR	Reverse Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion
RXR	Retinoid X- Rezeptor
SE	Oberflächenepithel
SF	Standardfehler
SG	Superfizielle Drüsenabschnitte
Sign.	Signifikanz(en)
TBS	Tris gepufferte NaCl-Lösung
VDR	Vitamin D-Rezeptor
VDRE	Vitamin D-Response Element
Vit D	Vitamin D

1 Zusammenfassung

Wegen des Aufbaus des foetalen Skeletts und der Ausscheidung über die Milch besteht zeitweise ein erhöhter Bedarf an Kalzium (Ca). Dieser wird durch eine gesteigerte Mobilisation von Ca aus dem Skelett sowie eine verstärkte Resorption aus dem Magen-Darm-Kanal gedeckt. Dazu trägt vor allem Vitamin D bei, welches über seine Rezeptoren (VDR) in der Darmschleimhaut Einfluss auf die Höhe der Ca-Resorption nimmt. Wird nicht ausreichend Ca mobilisiert, kann es zu hypokalzämischen Mangerscheinungen kommen.

Wegen ihrer zentralen Rolle für den Ca-Stoffwechsel wurden VDR in der Darmschleimhaut von geschlachteten und güsten Ziegen und Schafen sowie prä- und postpartal in wiederholt entnommenen Colonbiopsien beider Tierarten immunhistochemisch bestimmt.

VDR waren im Zytoplasma und in den Zellkernen von Enterozyten nachweisbar. Die stärksten VDR-Immunreaktionen bei den Schlachttieren waren im Duodenum und etwas abgeschwächt im Jejunum zu erkennen. In diesen Darmabschnitten war tief in den Krypten die stärkste Immunreaktion zu sehen und sie nahm zur Schleimhautoberfläche hin und längs der Zotten signifikant ab. Im Ileum sowie in Cäkum und Colon descendens war eine signifikant schwächere VDR-Immunreaktion zu verzeichnen und der Gradient innerhalb der Schleimhaut war nicht sichtbar. In den Biopsieproben waren im Verlauf der Laktation bei den Schafen - nicht jedoch bei den Ziegen - um den Geburtszeitpunkt niedrigere VDR-Mengen nachweisbar als zu den späteren Zeitpunkten der Laktation.

2 Abstract

A temporarily increased need for Ca can occur due to the development of fetal skeleton and excretion via milk. The higher demand for this element is met by both, increased mobilisation of Ca from the bones and increased resorption from the gastro-intestinal tract. A key factor in this physiological process is vit D, acting through VDR located in the mucosal wall of the intestines, thus potentially increasing Ca-resorption. As a consequence of inadequate mobilisation, Ca deficiency could emerge.

Immunohistochemical procedures were performed on goat and sheep intestinal mucosa to detect VDR. Biopsy samples of colon mucosa were taken at slaughter from animals pre- as well as postpartum.

Cytoplasm and nuclei of enterocytes stained positively for VDRs. Strongest immunoreactions were observed within the duodenum, slightly lower reactions were detected within the jejunum. In these parts of the small intestine strongest immunoreactions were recorded deep in the crypts. Staining significantly lost intensity towards the surface and along the villi. Ileum, cecum and colon descendens had a significantly weaker immunoreaction. There was no gradient to be observed within the mucosa. Biopsy samples taken from sheep during early lactation revealed a lower amount of the VDR. The amount increased within the course of lactation. Goats did show any sign of changed amount during lactation.

3 Einleitung

Der Kalziumstoffwechsel des domestizierten Wiederkäuers hat sich grossen Herausforderungen zu stellen. Aufgrund der hohen Milchleistung – Milch enthält grosse Mengen an Ca - muss viel von diesem Mineralstoff bereitgestellt werden. Dies geschieht durch Mobilisation endogener Depots sowie durch verstärkte Resorption aus der Nahrung. Ferner benötigt der Fötus während den letzten Wochen der Trächtigkeit für seine Entwicklung (Mineralisation des Skelettes) viel Ca. Ein Schaf z.B., welches sich in den letzten zwei Wochen einer Zwillingssträchtigkeit befindet, hat pro Tag einen Ca-Bedarf von mehr als 8 Gramm (Seyedmehdi et al. 2002). Eine 60 kg schwere Milchziege hat einen Bedarf von 2,5 g Ca/Tag für die Erhaltung. Im 4. und 5. Trächtigkeitsmonat steigt ihr Bedarf auf 7,5 bzw. 9,5 g/Tag (Kessler 2004). Gibt eine Milchziege 2 kg Milch pro Tag, benötigt sie (Erhaltung plus 2 kg Milch) 11 g Ca (Kessler 2004). Während der Laktation braucht ein 75 kg schweres Schaf mit 2 Lämmern 7,6 g Ca pro Tag (Sykes und Russel 2000). Gemäss Haenlein (1980) befinden sich in einem Liter Ziegenmilch 1,14 – 1,63 g Ca. Im Kolostrum ist der Ca-Gehalt höher. Wenn diese Menge Ca im Kolostrum via erhöhter Resorption aus dem Darm und erhöhter Mobilisation aus dem Knochen nicht gewährleistet wird, kommt es zur hypokalzämischen Gebärpause, auch Hypokalzämie genannt (Haenlein 1980). Beim Schaf liegt der Zeitraum einer möglichen Erkrankung zwischen dem 120. Trächtigkeits- und dem 25. Laktationstag (Behrens 2001), bei Ziegen mit hoher Milchleistung rund 2 Tage vor bis 2 Tage nach der Geburt (Behrens 2001). Zu diesem Zeitpunkt scheinen vermehrt ältere Ziegen an Hypokalzämie zu erkranken (Matthews 1999). Von Liesegang et al. (1998) wurde zuerst eine verminderte Ca-Resorption aus dem Knochen als eine mögliche Ursache der Hypokalzämie (Gebärparese) angenommen. Anhand der Ergebnisse jener Studie (Liesegang et al. 1998) wurde später von ihnen vermutet, dass jedoch eher eine mögliche Ursache der Hypokalzämie eine verminderte Ca-Resorption aus dem Darm der Grund sein könnte und nicht, wie zuerst angenommen, eine verminderte Ca-Resorption aus dem Knochen, da sich die 2 Gruppen (Kühe mit Gebärpause und Kühe ohne Gebärpause) bezüglich Knochenresorption nicht unterschieden. In einer weiteren Studie (Liesegang et al. 2000) wurde bei Milchkühen untersucht, ob die Milchleistung einen Einfluss auf den Knochenstoffwechsel und damit die Fähigkeit Ca aus dem Knochen freizusetzen, hat. Hier konnte gezeigt werden, dass Kühe mit höherer Milchleistung eine höhere Knochenresorptions- und Knochenformationsrate zeigten.

Integrales Element im Ca-Stoffwechsel ist neben anderen das Vit D. Im Darm erhöht es die Ca-Absorption. Seine Wirkung wird durch die VDR vermittelt. Diese befinden sich zum grössten Teil im Nukleus der Enterozyten, zu einem geringen Anteil aber auch im Zytoplasma (Nakada et al. 1984). Bislang wurden diese Rezeptoren lediglich bei einigen

Tierarten (Milde et al. 1989) wie Huhn (Pike und Haussler 1979), und Ratte (Walbert et al. 2001) sowie beim Menschen (Thomas et al. 1999) immunhistochemisch dargestellt.

Untersuchungen beim Rind haben einerseits ergeben, dass die Menge der VDR mit zunehmendem Alter abnehmen, und andererseits, dass die VDR-Anzahl während der Trächtigkeit und der Laktation erhöht und zum Zeitpunkt der Geburt kurzzeitig reduziert ist (Goff et al. 1991).

Beim kleinen Wiederkäuer liegen noch keine derartigen Untersuchungen vor. Deshalb war es das Ziel dieser Studie, das Vorkommen und die Verteilung der VDR im Darm am Beispiel von Schaf und Ziege zu ermitteln, um dadurch möglicherweise weitere Informationen über die Ursache und Entstehung der hypokalzämischen Gebärpause zu erhalten. Ferner soll mittels Verlaufsuntersuchung geklärt werden, ob der ermittelte Ca-Bedarf während der Hochträchtigkeit und der nachfolgenden Laktation sich auf die VDR-Menge im einzig leicht zugänglichen Darmabschnitt, dem Colon descendens auswirkt.

Aus diesem Grund wurden bei Milchschaafen und Saanenziegen Colonbiopsien gesammelt und immunhistochemisch auf das Vorhandensein des VDR untersucht.

4 Literaturübersicht

4.1 Topographie und Morphologie des Darmes beim kleinen Wiederkäuer

Der Darm lässt sich stark vereinfacht in den Dünndarm (Intestinum tenue) und in den Dickdarm (Intestinum crassum) unterteilen. Der Dünndarm wiederum gliedert sich wie in Abbildung 1 gezeigt in Duodenum, Jejunum und Ileum. Beim Duodenum (Zwölffingerdarm) werden folgende Anteile unterschieden: Pars cranialis, Pars descendens und Pars ascendens. Die Pars cranialis entspringt beim Wiederkäuer rechtsseitig im intrathorakalen Abschnitt der Bauchhöhle aus dem Pylorusteil des Labmagens. Im Bereich der Leberpforte bildet das Duodenum die S-förmige Ansa sigmoidea. Hier geht das Duodenum via Flexura duodeni cranialis in die Pars descendens über. Diese verläuft in horizontaler Richtung nach kaudal, wendet sich vor dem Tuber coxae mit der Flexura duodeni caudalis in scharfem Bogen medial und dann kranial. Die folgende Pars ascendens ist mit dem Colon descendens durch die Plica duodenocolica verbunden und zieht im Gekröse eingeschlossen nach kranial. Unter der Bauchspeicheldrüse geht die Pars ascendens in das Jejunum (Leerdarm) über. Das Jejunum liegt ventral und rechts im Bauchraum, hängt girlandenartig an der Colonscheibe und wird daher auch Kranzdarm genannt. Der kaudale Abschnitt des Jejunums ist infolge des hier längeren Gekröses leichter beweglich, ragt aus dem Recessus supraomentalis beckenwärts frei heraus und kann, je nach Füllungszustand des Magens bzw. des Darmes, auch in die Beckenhöhle eintreten oder aber um den kaudodorsalen Blindsack des Pansens herum die Medianebene nach links überschreiten.

Das Ileum (Hüft darm) stellt den letzten Teil des Dünndarmes dar. Es ist über seine gesamte Ausdehnung via Ligamentum ileocaecale mit dem Cäkum (Blinddarm) verbunden. Über das Ostium ileale mündet das Ileum ventromedial auf der Höhe des kaudalsten Punktes des Rippenbogens in das Cäkum.

Der Dickdarm besteht aus dem Cäkum (Blinddarm), dem Colon (Grimmdarm) und dem Rectum (Mastdarm). Siehe dazu Abbildung 1.

Das walzenförmige, glatte Cäkum liegt in halber Höhe des rechten Bauchraumes und ragt mit seinem gekrösefreien stumpfen Ende beckenwärts aus dem Recessus supraomentalis heraus. Die lange Blinddarmspitze weist nach kaudal.

Am Colon lassen sich folgende Teile unterscheiden: Colon ascendens, Colon transversum und Colon descendens.

Das Colon ascendens bildet die Colonscheibe (Grimmdarmspirale). Vor der Colonscheibe befindet sich als Anfangsschleife die S-förmige Ansa proximalis, an deren Ende folgt eine Endschleife, Ansa distalis genannt. Letztere besteht aus einem ersten, nach kaudal ziehenden Schenkel und einem zweiten, welcher nach kranial zieht und ins Colon transversum übergeht.

Das Colon transversum liegt als kurzer und enger Darmabschnitt hoch dorsal an der Bauchwand. Es zieht von rechts nach links zwischen der Arteria coeliaca und der Arteria mesenterica cranialis durch.

Das Colon descendens liegt im linken Bauchraum und zieht Richtung Beckeneingang.

Als letzter Darmabschnitt verläuft das Rectum ziemlich gerade und mittig innerhalb der Beckenhöhle. Es beginnt am Beckeneingang und endet am Übergang zum Anus (Vollmerhaus und Roos 1999).

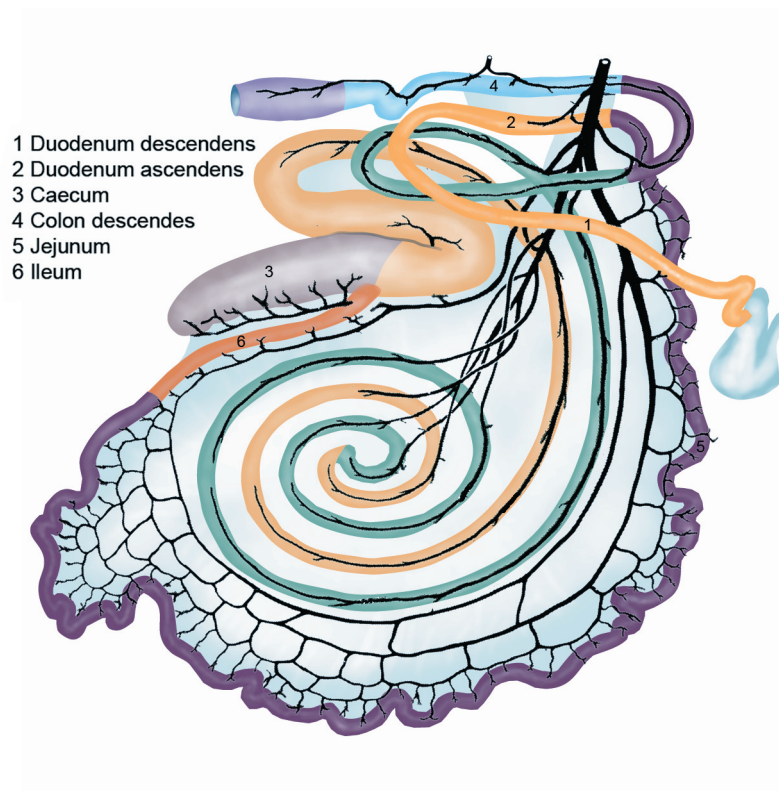


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Darms vom Wiederkäuer am Beispiel des Rindes aus (Vollmerhaus und Roos 1999)

4.2 Vitamin D

4.2.1 Begriffsdefinition von Vitamin D

Unter dem Begriff Vit D werden mehrere hydrophobe Verbindungen zusammengefasst, die auch als Calciferole bezeichnet werden. Die beiden wichtigsten Vertreter dieser Gruppe sind Ergocalciferol (= Vit D₂) und Cholecalciferol (= Vit D₃). Der einzige strukturelle Unterschied zwischen Vit D₂ und Vit D₃ besteht in den unterschiedlichen Seitenketten. Siehe dazu Abbildung 2, in welcher die beiden Vorstufen und ihre anschliessende Synthese zu den beiden Hormonen Vit D₂ und Vit D₃ dargestellt ist. Die Seitenkette von Vit D₂ enthält zusätzlich eine Doppelbindung zwischen C-22 und C-23 und an C-24 eine Methylgruppe (Holick 2003). Gemäss Horst et al. (1994) haben Vit D₂ und Vit D₃ bei den meisten Säugetieren dieselbe biologische Aktivität. Calciferole sind einerseits Steroid-Derivate, weil ihre Biosynthese aus steroidal Vorläufern erfolgt, andererseits werden sie korrekterweise auch als Hormone bezeichnet, da sie über zytosolische Rezeptorproteine unmittelbar am Zellkern angreifen und ihre Synthese endokrin kontrolliert wird (Kaune 2000).

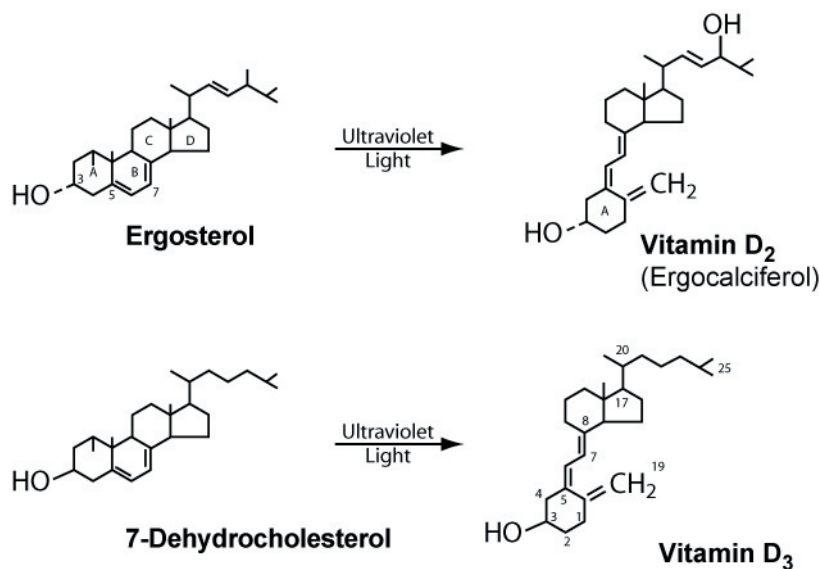


Abbildung 2: Synthese von Vitamin D₂ und Vitamin D₃ aus den entsprechenden Vorstufen unter Einwirkung von Sonnenlicht. (DeLuca 1979)

4.2.2 Stoffwechsel von Vitamin D

Vit D₂ kommt hauptsächlich in Pflanzen vor und wird beim Tier somit durch die Nahrung aufgenommen. Die Versorgung mit Vit D₃ hingegen erfolgt entweder ebenfalls durch Zufuhr mit der Nahrung (als Vitamin in tierischen Produkten oder als Provitamin 7-Dehydrocholesterol) oder durch Eigensynthese in der Haut.

4.2.2.1 Zufuhr mit der Nahrung

Das über die Nahrung zugeführte Vit D₃ und dessen Provitamin werden im Darm resorbiert, in Chylomikronen verpackt und mit der Lymphe zur Blutbahn transportiert. Wie in Abbildung 3 dargestellt, wird Vit D₃ selbst von der Leber aufgenommen und dort mittels 25-Hydroxylase (ein Zytochrom-P450-Enzym) zum 25-Hydroxycholecalciferol (25-(OH)-D₃) hydroxyliert. Diese Verbindung wird anschliessend erneut ins Blut abgegeben, zur Niere transportiert und dort mittels 1- α -Hydroxylase (ein weiteres Zytochrom-P450-Enzym) einer zweiten Hydroxylierung unterworfen. Es entsteht die aktive Verbindung 1,25(OH)₂D₃. Im Gegensatz zur 25-Hydroxylase in der Leber ist die Aktivität der 1- α -Hydroxylase der Niere streng reguliert. Parathormon (PTH) sowie abnehmende Konzentrationen an Ca und Phosphat im Blut stimulieren deren Aktivität, während sie durch 1,25(OH)₂D₃ selbst gehemmt wird (Kaune 2000). Bei Ratten konnte nachgewiesen werden, dass der zweite Hydroxylierungsschritt auch in der Plazenta stattfinden kann. Dieser Befund erklärt die wesentlich höheren 1,25(OH)₂D₃-Plasmaspiegel bei graviden und laktierenden Ratten, welche die hohen Anforderungen von Gravidität und Laktation an die Resorption von Ca widerspiegeln (Gropp 1987).

Provitamin D (7-Dehydrocholesterol) hingegen gelangt nach der Resorption aus dem Darm zuerst zur Haut, wo unter dem Einfluss von UV-Strahlung der Wellenlängen 280-320 nm eine photochemische Ringöffnung zwischen den C-Atomen 9 und 10 erfolgt. Das entstehende Vit D₃ (Cholecalciferol) gelangt über die Blutbahn zur Leber und durchläuft, wie das direkt aufgenommene Vit D, die beiden Hydroxylierungen in Leber und Niere zu 1,25(OH)₂D₃.

4.2.2.2 Eigensynthese

Das Ausmass der Eigensynthese ist von vielen Faktoren abhängig: vom Grad der Sonnenbestrahlung der Haut, von der Tageszeit, der Jahreszeit, der Meereshöhe und dem Alter. Wenn die Haut altert, enthält sie weniger 7-Dehydrocholesterol. Deshalb sinkt beim Menschen mit steigendem Alter die Kapazität zur Vit D-Synthese (Holick 2003). In der Leber entsteht 7-Dehydrocholesterol als letzte Vorstufe der Cholesterinsynthese. 7-Dehydrocholesterol wird zur Haut transportiert und hier, wie in Abbildung 2 gezeigt, durch UV-Bestrahlung in Vit D umgewandelt, danach zur Leber zurückgebracht. Abbildung 3 zeigt die beiden nachfolgenden Hydroxylierungen in Leber und Niere zu 1,25(OH)₂D₃ wodurch

das Vitamin biologisch aktiviert wird (DeLuca 1979).

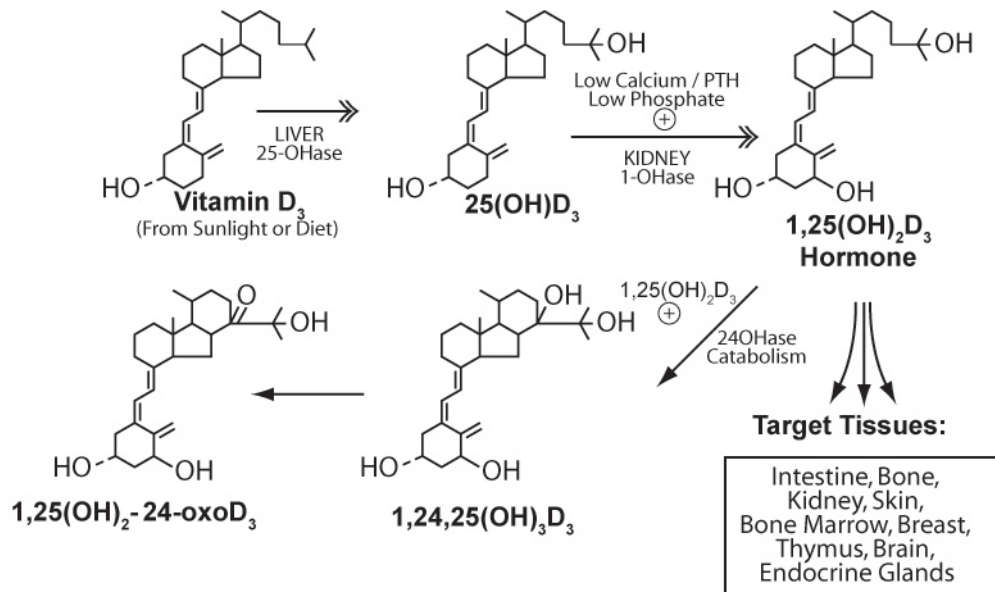


Abbildung 3: Aktivierungsschritte von Vitamin D₃ durch Hydroxylierung an Position C-25 in der Leber und an Position C-1 in der Niere. Tiefe Ca- und PTH-Werte im Blut aktivieren das Enzym 1- α -Hydroxylase in der Niere. (Haussler 1986)

4.2.2.3 Physiologische Wirkung von Vitamin D

Dem Vit D kommt zusammen mit den Hormonen Calcitonin und PTH eine zentrale Stellung bei der homöostatischen Kontrolle des Blut-Ca-Spiegels zu. Als Steroid beruht sein Wirkmechanismus auf einer Stimulierung der Transkription von Genen (Kaune 2000).

4.3 Kalzium-Stoffwechsel und Vitamin D

4.3.1 Kalzium-Absorption im Darm

Der Ca-Transport durch das Darmepithel erfolgt in beide Richtungen, d.h., er ist bidirektional. Ca kann im oberen Dünndarm sowohl resorbiert als auch mit den Verdauungssäften zusammen sezerniert werden (Oberleitner 1996). Ca kann über die gesamte Länge des Darmes absorbiert werden. Jedoch ist das Duodenum beim Mensch derjenige Darmabschnitt mit dem grössten Ca-Absorptionsvermögen (Oberleitner 1996). Untersuchungen von Schröder et al. (1995) am Ziegendarm haben gezeigt, dass sich, unabhängig vom Fütterungsregime (mit und ohne Ca-Mangelernährung), die höchste Bindungskapazität (B_{\max}) für den VDR im Jejunum befindet. Weiter zeigte sich, dass die Affinität (K_d) des Rezeptors

in den verschiedenen Lokalisationen des Darmes einheitlich ist und sich weder durch Ca- noch durch P-mangel verändern lässt (Schröder et al. 1995). Neuere In vitro-Ergebnisse derselben Gruppe zeigen, dass beim kleinen Wiederkäuer sowohl im prä-duodenalen Teil des Verdauungstraktes (Pansen) als auch im Dünndarm eine Ca-Nettoabsorption stattfindet (Schröder et al. 1997). Die Nettoabsorption von 1,1 g Ca pro Tag verteilt sich zu fast 50 % auf den präduodenalen Abschnitt des Magendarmtraktes, 35 % auf den Dünndarm und nur rund 15 % davon wurden im Dickdarm resorbiert (Schröder et al. 1997).

Grundsätzlich gibt es zwei Möglichkeiten der Ca-Absorption. Einer davon ist transzellulär aktiv, via Ca-bindendes Protein (Calbindin), gezeigt in Abbildung 4. Dieser, durch Ca vermittelte Weg ist grösstenteils beschränkt auf Duodenum und proximales Jejunum (Kaune 2000). Er ist beeinflussbar durch verschiedene Faktoren, wie zum Beispiel durch das Alter und die Höhe der Ca-Aufnahme. Mit zunehmendem Alter sinkt die Ca-Absorptionskapazität im Darm beim Rind (Horst et al. 1994). Parallel dazu sinken sowohl bei der Ratte als auch bei der Kuh die Anzahl VDR (Horst et al. 1994). Dadurch kann das ältere Tier weniger gut auf Vit D reagieren und die Adaptation der Ca-Absorption im Darm dauert länger (Horst et al. 1994).

Zusätzlich zu den eben beschriebenen Aktionen gibt es einen passiven, parazellulären Resorptionsweg durch das intestinale Epithel, welcher in der gesamten Länge des Darmes beschrieben wird (Goff et al. 1995). Bei einer grossen Ca-Menge auf der Lumenseite diffundiert Ca passiv. Experimentelle Studien zeigen, dass Tiere, welche mit viel Ca gefüttert werden, mehr als 50 % Ca passiv via parazellulären Transport aufnehmen (Horst et al. 1994). Hingegen dominiert bei einer niedrigen lumenseitigen Ca-Menge die aktive Absorption (Bronner 1987). Dieser Prozess benötigt Vit D, welches die Produktion des Calbindin (Ca-bindendes Protein) stimuliert.

Beim Vorgang der aktiven Ca-Resorption gelangt Ca zunächst passiv entlang einem steilen elektrochemischen Gradienten durch Ca-Kanäle der Bürstensaummembran in das Zytoplasma, da die Konzentration an freiem Ca im Zytoplasma der Enterozyten des Zottenepithels sehr gering ist ($< 1 \mu\text{mol/l}$). Im Zytoplasma wird Ca daraufhin reversibel an Calbindin gebunden, zum basolateralen Plasmalemm transportiert und dann durch einen primär aktiven Ausschleusungsprozess mittels Ca-Pumpe (= Ca^{2+} -ATPase) sowie mittels transmembranösem Na^+ -Gradienten angetriebenen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschern, aus der Zelle in den Interzellularspalt exportiert. Die Ca-Pumpe arbeitet gegen einen 1000-fachen Konzentrationsgradienten. Ihre Aktivität wird zudem durch Vit D gesteigert (Horst et al. 1997b).

Die Öffnung der obengenannten, an der intestinalen Bürstensaummembran gelegenen Ca-Kanälen, wird durch Bindung von Vit D an den zugehörigen, spezifischen und intrazellulär gelegenen VDR vermittelt (Oberleitner 1996).

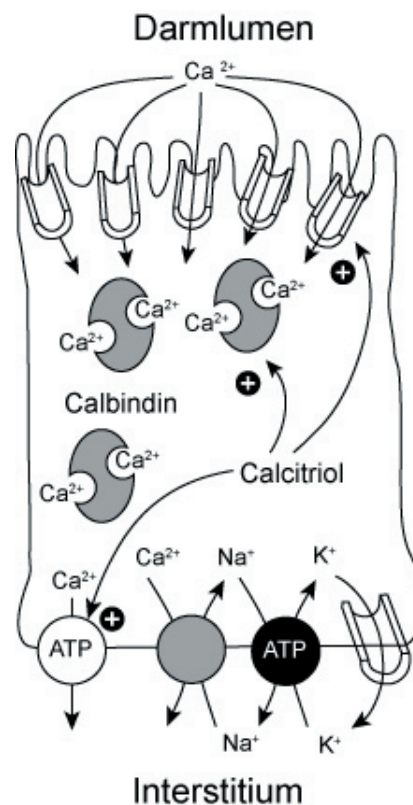


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Einflusses von Vitamin D auf die Ca-Resorption im Darm. Vitamin D (Calcitriol) fördert die aktive Ca-Aufnahme durch Stimulierung des Ca-bindenden Proteins Calbindin. Nach Transport zur basolateralen Zellmembran erfolgt hier die aktive Ausschleusung ins Interstitium (Kaune 2000).

4.3.2 Weitere Wirkungsorte von Vitamin D

Zusammen mit PTH fördert Vit D, (Abbildung 5) aus dem Knochen die Ca-Mobilisation durch Stimulierung der Osteoklasten (Horst et al. 1997b). Ebenfalls synergistisch mit PTH fördert Vit D die tubuläre Reabsorption von Ca in der Niere (Horst et al. 1997b).

4.3.3 Verteilung des Kalziums im Körper

Ca und Phosphat sind durch ein konstantes Löslichkeitsprodukt untrennbar miteinander verbunden (Oberleitner 1996).

Beinahe die gesamte Ca- (99,5 %) und Phosphormenge (75 %) des Körpers liegt im Knochen im Verhältnis 2:1 als Hydroxyapatitkristalle ($\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6[\text{OH}]_2$) vor (Sykes und Russel 2000). Die Kristalle sorgen für die Festigkeit des Knochens und dienen als reversibler Speicher, in

den, je nach Bedarf, Ca eingelagert oder aus dem Ca mobilisiert werden kann (Oberleitner 1996). Ein kleiner Anteil des im Knochen befindlichen Ca ist als schnell mobilisierbares Ca in den Flüssigkeiten, welche die Knochenzellen umgeben und sich in den Canaliculi der Knochen befinden, gelöst (Goff et al. 1991). Nach PTH-Stimulierung kann dieser Teil (bei der erwachsenen Milchkuh 6-10 g) des Ca durch Vermittlung der Osteoklasten schnell in die extrazelluläre Flüssigkeit abgegeben werden (Goff et al. 1991).

Die Ca-Menge im Plasma setzt sich aus drei Teilen zusammen: dem freien, ionisierten Ca (45-50 %), dem an Albumin gebundenen Ca (40 %) und dem Komplex-gebundenen Ca (10-15 %) (Habicht und Watschinger 2001). Je höher die Eiweisskonzentration im Plasma ist, umso grösser ist der gebundene Anteil des Ca im Plasma (Oberleitner 1996). Biologisch aktiv ist nur die freie Form des Ca, sprich, lediglich das ionisierte Ca ist für die Funktion der Muskel- und Nervenzellen von Bedeutung (Martig 2002). Da jedoch das freie und das gebundene Ca gut miteinander korrelieren, genügt es, die Menge des Gesamt-Ca im Blutplasma zu bestimmen, um eine Aussage über die Versorgung des Tieres mit Ca machen zu können. Der Ca-Gehalt im Plasma beim Schaf variiert zwischen 1,5 bis 3 mmol/l, wobei 50 bis 60 % davon schwach an Albumin gebunden sind (Sykes und Russel 2000). Junge noch wachsende Schafe haben Ca-Konzentrationen, welche eher im oberen Referenzbereich liegen. Diese Werte sinken kontinuierlich bis zum Erwachsenenalter von 15 bis 18 Monaten (Sykes und Russel 2000). Bei der Ziege wird der Ca-Gehalt im Plasma mit 2,22 bis 2,92 mmol/l angegeben (Seyedmehdi et al. 2002).

75 % des Phosphats befinden sich beim Menschen im Knochen. Intrazellulär kommen sowohl anorganische Phosphate als auch organische Moleküle, wie ADP, ATP und cyclisches AMP vor. Im Plasma findet man sowohl saures (H_2PO_4^-) als auch alkalisches Phosphat (HPO_4^{2-}) (Habicht und Watschinger 2001).

4.3.4 Zusammenspiel zwischen Vitamin D und anderen Hormonen bei der Kalzium-Homöostase

Mindestens zwei weitere Hormone erhalten die Ca-Homöostase: PTH und Calcitonin. Zielorgane sind wie in Abbildung 5 gezeigt Darm, Knochen und Niere.

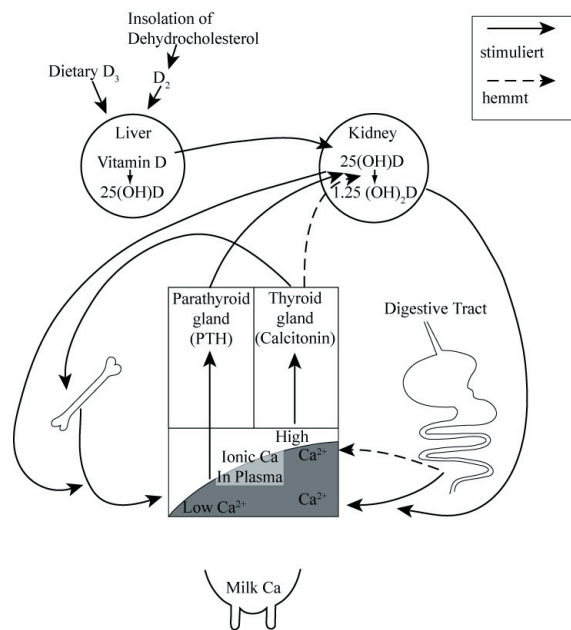


Abbildung 5: Regulation des Plasma-Ca-Spiegels durch PTH und Calcitonin. Bei niedrigem Plasma-Ca-Spiegel verstärkte PTH-Synthese mit nachfolgender Stimulierung der Hydroxylierung in der Niere und einer vermehrten Ca-Mobilisierung aus dem Knochen. Calcitonin, bei hohen Plasma-Ca-Werten ausgeschüttet, hemmt dieselben Prozesse. Modifiziert nach Martin (2000).

4.3.4.1 Parathormon

PTH ist ein Polypeptid aus 84 Aminosäuren. Die Plasmakonzentration des ionisierten Ca wird über einen Ca-sensing-Rezeptor in der Membran der PTH-sezernierenden Hauptzellen der Epithelkörperchen (Nebenschilddrüsen) gemessen (Kaune 2000). Fällt der ionisierte Anteil des Plasmakalziums unter die Norm, wird PTH aus den Epithelkörperchen freigesetzt und gelangt in Sekundenschnelle über die Blutbahn an seine Zielzellen. Rezeptoren für PTH finden sich auf den Epithelzellen der Nierentubuli, den Osteoblasten und den endostalen Knochenbelegzellen. Parathormon verhindert eine länger andauernde Hypokalzämie dadurch, dass es im Knochen zur raschen Mobilisierung der in kristallinen Strukturen vorliegenden Mineralien führt. Das dabei freigesetzte Ca gelangt in die Blutbahn.

Weil reife Osteoklasten keine Rezeptoren für PTH besitzen, erhöht PTH einerseits die Osteoklastenaktivität innerhalb von Minuten über einen indirekten, durch Osteoblasten vermittelten Vorgang. Via PTH-Rezeptoren auf den Osteoblasten werden diese dazu stimuliert, vermehrt Osteoid abzulagern. Zusätzlich wird durch die Bindung des PTH an die Osteoblasten innerhalb von Stunden und Tagen direkt die Rekrutierung und Fusionierung von Präosteoklasten zu reifen Osteoklasten gesteigert, was dazu führt, dass reifer Knochen

abgebaut wird (Sykes und Russel 2000). Bei längerer Stimulation der Knochenresorption durch PTH kommt es deshalb zur Zunahme der Osteoklastenzahl und in der Folge auch zu einer Zunahme der Remodeling-Aktivität (Kaune 2000). Diese Remodeling-Aktivität resultiert also im Ersetzen von gut mineralisiertem altem Knochen durch unmineralisierten neuen Knochen. Letzterer wird später mineralisiert, jedoch kommt es zu Beginn dieses Prozesses zu einer Nettoresorption von Ca aus dem Knochen, um den erhöhten Bedarf decken zu können (Sykes und Russel 2000).

Im proximalen Tubulus der Niere hemmt PTH die Rückresorption von Phosphat. Dadurch wird dieses vermehrt ausgeschieden, so dass das aus den abgebauten Hydroxyapatitkristallen ebenfalls freigewordene Phosphat die Löslichkeit der lebenswichtigen Ca-Ionen im Plasma nicht beeinträchtigen kann. Gleichzeitig führt PTH in der Henleschen Schleife und im distalen Tubulus der Niere zu einer vermehrten Resorption von Ca. Dadurch bleibt das aus dem Knochen mobilisierte Ca dem Organismus erhalten (Goff et al. 1991).

Bei Ca-Werten im Blut von $< 2,5$ mmol/l werden die Nebenschilddrüsen aktiviert und produzieren vermehrt PTH (Horst et al. 2003), welches die Aktivität der 1- α -Hydroxylase steigert und damit die Bildung von Vit D fördert. Zudem hemmt PTH die Bildung von 24,25(OH)₂D (Goff et al. 1991).

Eine Erhöhung des Ca-Einstroms vom Darm ins Plasma erhöht dort wiederum die Konzentration der frei zirkulierenden Ca-Ionen, was bei Ca-Werten im Blut von $> 2,5$ mmol/l zur Unterdrückung der PTH-Sekretion führt. Nachfolgend wird die Vit D-Synthese unterdrückt (Horst et al. 2003). Das Gleichgewicht zwischen der Aktivität der Osteoklasten (Knochenabbau) und der Osteoblasten (Knochenaufbau) verschiebt sich zugunsten letzterer, die Knochenmatrix nimmt zu und wird durch das auf dem Blutweg heranflutende Ca kalzifiziert (Goff et al. 1991).

Die Halbwertszeit von PTH beträgt weniger als drei Minuten. Der grösste Teil des Hormons wird in den Kupfferschen Sternzellen und den Hepatozyten (60-70 %), den Tubuluszellen der Niere (20-30 %), aber auch in einem geringen Anteil in anderen Organen abgebaut. Der schnelle Metabolismus von PTH gewährleistet, dass das für die Rezeptor-Bindung zur Verfügung stehende PTH ausschliesslich von der Sekretionsrate der Nebenschilddrüse als Antwort auf kurzfristige Veränderungen der Ca-Ionen-Konzentration, abhängig ist (Liel et al. 1999).

4.3.4.2 Calcitonin

Das Peptidhormon Calcitonin wird in den C-Zellen (parafollikuläre Zellen der Schilddrüse) gebildet. Es ist ein Polypeptid aus 32 Aminosäuren (Kaune 2000). Abbildung 5 zeigt, dass eine Erhöhung des Spiegels an ionisiertem Ca im Plasma über die Norm hinaus bewirkt, dass Calcitonin freigesetzt wird, worauf Ca im Skelett eingelagert wird. Weiterhin fördern auch Gastrin und Cholecystokinin die Sekretion von Calcitonin. Calcitonin ist der Gegenspieler von PTH, bezüglich Ca-Metabolismus des Knochens betrifft. In der Niere jedoch wirken beide

Hormone synergistisch: sowohl PTH als auch Calcitonin finden an Zellen des proximalen Tubulus und der Henleschen Schleife spezifische Membranrezeptoren vor und führen dort zu Phosphaturie (verstärkte Phosphatausscheidung) und Antikalziurese (verstärkte Ca-Resorption) (Goff et al. 1991). Es ist jedoch bekannt, dass weder das Fehlen von Calcitonin (z.B. nach totaler Schilddrüsenentfernung) noch dessen massive Überproduktion (z.B. bei C-Zell-Karzinomen) zu wesentlichen Störungen der Ca-Homöostase führen.

4.4 Hypokalzämie

4.4.1 Definition und Vorkommen, prädisponierende Faktoren

Bei der Hypokalzämie handelt sich um eine nicht fieberhafte Erkrankung des Wiederkäuers. Die Krankheit äussert sich vorwiegend bei ausgewachsenen Milchkühen, bei welchen ein akutes Ca-Defizit progressive neuromuskuläre Dysfunktionen mit schlaffer Lähmung, Kreislaufkollaps und Bewusstseinsveränderungen verursacht (Oetzel 1988). Die Krankheit tritt bei Milchkühen rund um den Geburtszeitraum auf und ist labordiagnostisch charakterisiert durch Blut-Ca-Werte unter der Norm. Mit zunehmender Milchleistung steigt die Inzidenz dieser Krankheit (Oetzel 1988). Es handelt sich einerseits um eine leistungs- und andererseits um eine altersabhängige Stoffwechselstörung. Die Heretabilität der Störung bei der Milchkuh wird unterschiedlich, mehrheitlich aber als gering (< 0.1) beurteilt (Rüsch und Rusch 1996).

Bei Jungrindern, Ziegen und Schafen treten Hypokalzämien ebenfalls auf, jedoch mit einer deutlich niedrigeren Inzidenz (Oetzel 1988). Beim kleinen Wiederkäuer äussert sich eine Hypokalzämie in variablen klinischen Anzeichen. Tetanie ist beim Schaf häufiger und tritt deutlicher hervor, obwohl es hier auch zu einer schlaffen Lähmung kommen kann (Oetzel 1988). Ziegen präsentieren sich klinisch ähnlich wie die Milchkuh. Initial kommt es zu Ataxie und Hyperaktivität. Beides wird bald durch Festliegen abgelöst. Es folgen Konstipation, reduzierte Pansenmotorik und Blähung (Sayedmehdi et al. 2002).

4.4.2 Pathogenese der Hypokalzämie bei den verschiedenen Wiederkäuern

4.4.2.1 Milchkuh

Die Ursache der Hypokalzämie ist die extreme Steigerung des Ca-Bedarfs durch die beginnende Laktation beim Abkalben (Martig 2002). Grosse Mengen Ca gelangen, gebunden an Kasein und Zitrat, in die Milch und ins Kolostrum (Horst et al. 1997a). Abbildung 6 zeigt die Regulationsmechanismen der Ca-Homöostase am Beispiel der Milchkuh. Nur 0,3 %, das

entspricht 15-20 g, des im Körper der Kuh vorhandenen Ca sind rasch verfügbar. Ergänzt wird dieses Ca durch im Darm aufgenommenes und durch aus Knochen resorbiertes Ca. Durch das im Darm aufgenommene Ca wird der Fötus während der Trächtigkeit zur Skelettentwicklung mit Ca versorgt. Während des Trockenstehens ist der Ca-Bedarf mit 10 bis 12 g pro Tag minimal (zusätzlich zu den fäkalen Verlusten kommen 4-5 g/Tag für die Entwicklung des Skelettes des Föten) (Horst et al. 2003). Ein Liter normale Kuhmilch enthält etwa 1,25 g Ca. Kolostrum dagegen enthält 1,8 bis 2,5 g/l Ca (Martig 2002). Mit Beginn der Milchproduktion nimmt somit der Bedarf an Ca innert 1 bis 2 Tagen massiv zu (Martig 2002). Dadurch kommt es zu einer negativen Ca-Bilanz, wobei die Ca-Konzentration im Serum von 1,9 mmol/l nicht wesentlich unter den Referenzwerten liegt (Referenzbereich Kuh: 2,1-2,7 mmol/l (Martig 2002). Bei Kühen, welche an Hypokalzämie erkranken, sinkt die Ca-Konzentration im Blut meist unter 1,5 mmol/l (Martig 2002). Der Grund hierfür liegt in ungenügender, zu langsamer Adaptation des Ca-Stoffwechsels an die rasch steigenden Bedürfnisse der Milchkuh.

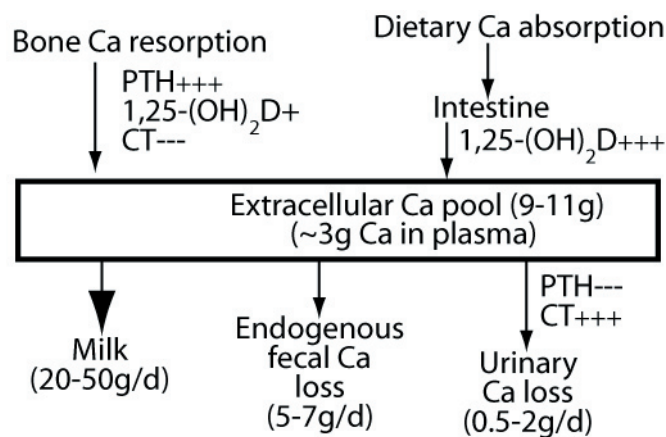


Abbildung 6: Ca-Homöostase am Beispiel einer Milchkuh. Im Darm wird durch Vit D die Ca-Absorption gefördert. Im Knochen kommt es durch PTH zu einer verstärkten Ca-Resorption; Ca-Verluste in Milch, Feces und Urin. PTH= Parathormon. CT= Calcitonin (Goff et al. 1991).

Wie unter 4.3.2 bereits erwähnt, fördert Vit D die Resorption von Ca aus dem Darm und, gemeinsam mit PTH, diejenige aus dem Knochen. Bei tiefen Ca-Werten im Blut kommt es zu einer vermehrten Ausschüttung von PTH, welches wiederum zum Anstieg von Vit D führt. Mit einer Latenzzeit von 24 h verbessert sich dadurch die aktive Ca-Resorption aus dem Darm. Bis die Mobilisierung von Ca aus dem Knochen einsetzt, dauert es im Normalfall 48 oder mehr Stunden (Martig 2002).

Bei Kühen mit Hypokalzämie sind in der Regel sowohl die PTH- als auch die Vit D-Plasma Spiegel erhöht (Horst et al. 1994). Kühe, welche an Hypokalzämie erkranken, unterscheiden sich von gesunden dadurch, dass ihre Zielorgane (Darm und Knochen) ungenügend oder verspätet auf diese hormonellen Stimuli reagieren (Martig 2002). Ein

Grund für die Entstehung der Hypokalzämie liegt vermutlich in der mit zunehmendem Alter abnehmenden Konzentration an VDR (Horst et al. 1989). Eine weitere Ursache für die refraktäre Antwort auf hormonelle Stimuli ist möglicherweise darin zu suchen, dass bei reichlichem Angebot von Ca im Futter, am Ende des Trockenstehens, die Kuh ihren Bedarf fast ausschliesslich mit dem passiv resorbierbaren Ca zu decken vermag. Die an die Wirkung der Stoffwechselhormone gebundene aktive Resorption wird nicht beansprucht, weil die Sekretion von PTH wegen des hohen Gehaltes an Ca im Plasma und somit auch die Bildung von Vit D in höheren Mengen nicht nötig ist. Dadurch nimmt wiederum die Zahl der VDR ab (Martig 2002). Zudem ist bekannt, dass bei Tieren im Zustand der metabolischen Alkalose (siehe dazu auch Abbildung 7) sowohl die Nieren als auch die Knochen auf den Stimulus des ausgeschütteten PTH nicht oder erst mit zeitlicher Verzögerung reagieren können (Martig 2002). Zu einer metabolischen Alkalose kommt es durch Fütterung von Rationen mit hohem Kationen-Gehalt (v.a. Kalium). Allergings konnte gezeigt werden, dass sich die Knochenresorption zwischen hypo- und normokalzämischen Kühen nicht unterscheidet (Liesegang et al. 1998).

Die in der Regel nachweisbare Hyperglykämie lässt sich dadurch erklären, dass durch die Hypokalzämie die Ausschüttung von Insulin gehemmt wird und zum Teil zusätzlich wegen gleichzeitiger Hyperkortisolämie eine Insulinresistenz besteht (Martig 2002).

4.4.2.2 Schaf

Hypokalzämie entsteht beim Schaf durch das Unvermögen des endokrinen Systems, den Ca-Einstrom aus Knochen und Verdauungstrakt adäquat zu steigern (Sykes und Russel 2000). Zudem kommt es beim Schaf häufig zu Zwillingssgeburten, was bedeutet, dass der Ca-Bedarf zusätzlich gesteigert wird. Kommt es zu einer abrupten Erhöhung des Ca-Bedarfs, benötigt der Körper einen oder mehrere Tage, um genügend Hormone für die Ca-Mobilisation aus dem Knochen zu generieren. Grosse Mengen an resorbiertem Ca, Phosphor (P) oder bestimmten Kationen (Na, Ka) senken die PTH-Produktion, was dazu führt, dass weniger Vit D produziert wird. Dies wiederum resultiert in einer reduzierten Ca-Resorption aus Darm und Knochen (Seyedmehdi et al. 2002).

4.4.2.3 Ziege

Bei allen Ziegen entsteht gemäss Matthews (1999) um den Geburtszeitpunkt ein Ca-Abfall im Blut bedingt durch die beginnende Milchproduktion. Dies konnten Liesegang et al. (2005) jedoch nicht bestätigen. Bei denjenigen Ziegen, welche an Hypokalzämie erkranken, kommt es jedoch zu einem grösseren Ca-Abfall im Blut infolge des Unvermögens des Ca-Metabolismus, den erhöhten Bedarf zu decken (Matthews 1999).

4.4.3 Pathophysiologie

Da Ca für die Sekretion des Neurotransmitters Azetylcholin an der neuromuskulären Endplatte verantwortlich ist, führt eine inadäquate Ca-Verfügbarkeit zu Lähmungen. Infolge Mindersekretion von Azetylcholin kommt es zur Blockierung der Nervenimpulse sowohl an der motorischen Endplatte als auch am Muskel selbst. Ein weiterer Effekt der Hypokalzämie besteht in einer reduzierten Muskelkontraktilität aufgrund reduzierter Aktin-Myosin-Interaktionen (Oetzel 1988).

Impulsweiterleitung zu peripheren Nerven und Muskelfibrillen werden durch den membranstabilisierenden Effekt des Ca vermittelt. Deshalb kann es bei Hypokalzämie beim Wiederkäuer zu beschleunigter Impulsweiterleitung oder zu spontanen Muskelzuckungen kommen. In einer frühen Phase der Erkrankung zeigen sich bei der Milchkuh deshalb klinische Anzeichen wie Hyperästhesie und Tetanie. Erst im späteren Verlauf treten schlaffe Lähmungen als Zeichen der kompletten Blockade der neuromuskulären Funktion auf (Oetzel 1988).

Hypophosphatämie und Hypermagnesiämie, welche bei der klassischen Hypokalzämie auch nachgewiesen werden können, können einen Teil zur Pathogenese dieser Erkrankung beisteuern. Bei tiefen Phosphorwerten im Blut wird die schlaffe Lähmung verstärkt. Hypermagnesiämie kann ebenfalls zu einer Verstärkung der schlaffen Lähmung führen. Bei zu viel Magnesium im Blut wird an der neuromuskulären Endplatte die Azetylcholinausschüttung geschwächt, was wiederum die neuromuskuläre Blockade verstärkt (Oetzel 1988).

4.4.4 Klinische Anzeichen und Folgeerkrankungen

4.4.4.1 Milchkuh

Hypokalzämie ist eine der häufigsten metabolischen Erkrankungen der Milchkuh, wobei nicht alle Rassen gleich stark betroffen sind. Am häufigsten erkranken Jerseys und Guernseys, Holstein- und Brown-Swiss-Kühe hingegen deutlich seltener (Oetzel 1988). Die Ursache für diese Rassenprädisposition ist nicht vollständig geklärt, kann aber teilweise durch die höhere Milchproduktion pro Einheit Körpergewicht bei den am stärksten betroffenen Rassen erklärt werden (Allen und Sansom 1986). Gemäss Untersuchungen an Milchkühen von Rüschi und Rusch (1996) beträgt die durchschnittliche Inzidenz in der Schweiz 5,2 %, wobei sie mit steigendem Alter zunimmt.

Tabelle 1 zeigt die durchschnittliche Häufigkeitsverteilung der Hypokalzämie bei der Milchkuh in Relation zum Geburtszeitpunkt. Weitaus am häufigsten tritt die Erkrankung innert 24h nach der Geburt auf. Hingegen kommt es selten vor und mit der Geburt zur

Hypokalzämie. Mit zunehmendem Alter steigt das Risiko an Hypokalzämie zu erkranken, während die Fähigkeit, aus Knochen Ca zu mobilisieren, abnimmt. Parallel dazu steigt die Milchproduktion an, welche in der vierten Laktation ihren Höhepunkt erreicht. Erstlingskühe erkranken wohl deshalb sehr selten an Hypokalzämie (Oetzel 1988).

Tabelle 1: Hypokalzämievorkommen bei der Milchkuh in Relation zum Geburtszeitpunkt (Oetzel 1988).

Zeitpunkt	Anzahl Prozent
vor Geburt	3
mit Geburt	6
bis 24h nach Geburt	75
24-48h nach Geburt	12
> 48h nach Geburt	4

Klinisch lässt sich die Erkrankung in drei Stadien einteilen:

Das Stadium I ist mit einer Stunde nur sehr kurz. Anzeichen, wie milde Nervosität und Tetanie, ohne dass die Kuh festliegt, werden oft übersehen. Die Tiere können zusätzlich Anorexie, Hypersensitivität, Schwäche, Gewichtsverlagerungen und einen schlurfenden Gang der Hinterbeine zeigen. Oft werden eine Tachykardie und eine milde Hyperthermie festgestellt, ausgelöst durch die erhöhte Muskelaktivität (Oetzel 1988).

Eine Kuh in Stadium II, welches 1 bis 12 Stunden dauern kann, befindet sich in Sternallage, sekundär zu einer schlaffen Lähmung. Feiner Muskeltremor ist dabei überwiegend in der Tricepsmuskulatur zu beobachten. Es werden eine hohe Herzfrequenz und leise Herztöne festgestellt. Weil Ca für die Herzkontraktilität notwendig ist, resultiert eine Hypokalzämie in reduzierter Herzleistung und somit erniedrigtem arteriellen Blutdruck (Daniel und Moodie 1978). Die Rektaltemperatur liegt zwischen 35,6° und 37,8°C. Hypokalzämie schwächt nicht nur die Herzmuskulatur sondern auch die glatte Muskulatur. Dadurch kommt es zur gastrointestinalen Atonie, milder Aufblähung, Konstipation und Verlust des Analreflexes. Durch die Lähmung des Musculus dilatator pupillae liegt oft eine nicht auf Licht reagierende Pupille vor (Oetzel 1988).

Tiere in Stadium III, welche unbehandelt nicht länger als ein paar Stunden überleben, liegen in Seitenlage und zeigen einen progressiven Bewusstseinsverlust. Die kaum mehr hörbare Herztätigkeit ist mit einer Herzfrequenz von bis zu 120 Schlägen pro Minute verbunden. Aufgrund des niedrigen arteriellen Blutdruckes ist oft kein Puls spürbar (Oetzel 1988).

Als Folgeerscheinungen kommt es zu einer bis 14 % reduzierten Milchproduktion, Nachgeburtsverhaltungen, Labmagenverlagerungen, Mastitiden (E. coli) und Ketosen (Horst

et al. 1997b). Aufgrund der noch anhaltenden Muskelschwäche kann es zu Blähungen, Rektal- und Uterusprolaps kommen (Oetzel 1988).

4.4.4.2 Schaf

Schafe geben im Allgemeinen – und abgesehen von wenigen speziellen Rassen - einerseits weniger Milch als Kühe und andererseits besteht eine stärkere fetoplazentale Verbindung, vor allem bei Schafen, welche mehrere Föten austragen, wodurch Ca einfacher zu den Föten gelangen kann. Deshalb äussert sich Hypokalzämie häufiger schon in der späten Trächtigkeit und nicht postpartal, wie bei der Milchkuh. Es können bis zu 30 % einer Herde betroffen sein (Oetzel 1988), überwiegend zwischen dem 120. Trächtigkeitstag und dem 25. Laktationstag (Sykes und Russel 2000). Gemäss Seyedmehdi et al. (2002) kann Hypokalzämie sogar bis zu 6 Wochen nach der Geburt auftreten. Den grössten Ca-Bedarf haben Tiere mit mehr als einem Föten im Zeitraum von 3 bis 4 Wochen vor der Geburt wegen der Kalzifizierung der Fetalskelette. Ein tagelanges, latentes Stadium geht voraus (Behrens 2001), bis es zu sensomotorischen Ausfallserscheinungen wie schlaffe Lähmung, starkem Muskelzittern oder Tetanie (ähnlich jenem bei Hypomagnesiämie) kommt. Betroffene Tiere zeigen zuerst einen steifen und unkoordinierten Gang, bevor sie in starrer Sternallage zum Festliegen kommen (Oetzel 1988).

Wie bei der Milchkuh kommt es zu Inappetenz. In Verbindung mit einer Inaktivität des gesamten Verdauungstraktes wird eine weitere enterale Aufnahme von Ca unterbrochen und die Hypokalzämie beschleunigt sich. Bei länger bestehender Hypokalzämie kommt es zur gestörten enteralen und renalen Kaliumabsorption. Somit entsteht eine sekundäre Hypokaliämie, die ihrerseits wiederum lähmend auf Skelett- und Herzmuskel einwirkt und in zahlreichen Fällen wahrscheinlich zum letalen Verlauf beiträgt. Zu Beginn der Hypokalzämie leiden rund 60 % der Tiere an Hyperglykämie, die oft von Glucosurie begleitet wird. Zudem ist regelmässig eine Azetonurie feststellbar, die jedoch, nicht wie bei der Trächtigkeitstoxikose, durch erhöhte Plasmakonzentrationen, sondern durch eine renotubuläre Reabsorptionsstörung hervorgerufen wird (Behrens 2001).

4.4.4.3 Ziege

Ziegen haben ein grosses Potential für eine hohe Milchleistung und die Tendenz, mehrere Ziegenlämmer auszutragen. Deshalb kann es hier, entweder vor der Geburt oder auch danach, zu einer Hypokalzämie kommen (Oetzel 1988). Wird bei Ziegen durch intensive Haltung eine hohe Milchleistung erzielt, tritt häufiger die postpartale Form auf, obwohl die Inzidenz niedriger ist als bei der Milchkuh (Guss 1977). Bei extensiver Haltung, welche nicht auf eine hohe Milchproduktion ausgerichtet ist, kommt es eher zur präpartalen Form (Oetzel 1988).

Klinisch äussert sich die Erkrankung vor der Geburt ähnlich wie beim Schaf und schliesst sowohl Überempfindlichkeit mit Tetanie als auch schlaaffe Lähmungen ein. Milchziegen mit Anzeichen einer typischen Hypokalzämie (d. h. nach der Geburt) entwickeln weniger starke Symptome als Milchkühe (Oetzel 1988).

4.4.5 Differentialdiagnosen

Bei der **Milchkuh** ist in den Stadien II und III an eine perakute toxische Infektion zu denken, beispielsweise an E. coli-Mastitis, E. coli-Metritis, Peritonitis oder an Aspirationspneumonie. Möglich ist auch ein primäres muskuloskeletales Geschehen (Oetzel 1988).

Beim **Schaf** ist die wichtigste Differentialdiagnose während der späten Trächtigkeit die Trächtigkeitstoxikose (Oetzel 1988). Bei beiden Erkrankungen kann Ketonurie beobachtet werden und nicht selten sind Trächtigkeitstoxikose und Hypokalzämie sogar kombiniert anzutreffen. Im Gegensatz zur Trächtigkeitstoxikose können jedoch bei einer Hypokalzämie häufig Glucosurie und Hyperglykämie nachgewiesen werden (Behrens 2001). Anlässlich post-mortaler Untersuchungen kann bei einem Tier mit Trächtigkeitstoxikose eine weisse Leber als Zeichen einer fettigen Leberdegeneration angetroffen werden, dagegen wird bei einem Tier mit Hypokalzämie keine solche makroskopisch sichtbare Veränderung festgestellt (Sykes und Russel 2000).

Bei der Hypomagnesämie als weiterer Differentialdiagnose, welche meist 4 bis 6 Wochen nach der Geburt auftritt (Sykes und Russel 2000), dominieren anfallsweise einsetzende, tonisch-klonische Krämpfe. Sensomotorische Ausfallserscheinungen kommen dagegen kaum vor. Weiterhin ist auch an infektiöse Krankheitsursachen (z.B. Listeriose) zu denken (Behrens 2001).

Differentialdiagnosen bei der **Ziege** schliessen folgende Erkrankungen ein: Trächtigkeitstoxikose, Enterotoxämie und Hypoglykämie (Oetzel 1988).

4.4.6 Klinische Pathologie

Die klinische Pathologie ist bei allen Wiederkäuern recht ähnlich. Die Bestimmung des Serum-Ca-Spiegels ist der Standardtest, um die Diagnose zu bestätigen. Sinnvoller wäre die Messung der Menge des ionisierten Ca, da dies die metabolisch aktive Form darstellt. Die Bestimmung des Gesamt-Ca beinhaltet sowohl die Menge des Protein-gebundenen als auch des komplexierten Ca. Beide Formen haben jedoch keinen Einfluss auf die neuromuskuläre Funktion (Oetzel 1988). Solange der Säure-Base-Haushalt oder

der Proteinmetabolismus nicht gestört sind, entspricht der Serum-Ca-Spiegel ziemlich genau der Menge des ionisierten Ca (Carlstrom 1970) und ist deshalb ein akzeptabler diagnostischer Test (Oetzel 1988). Serum-Ca-Werte unter 1 bis 1,25 mmol/l bei Schaf und Ziege sind diagnostisch für eine Hypokalzämie (Seyedmehdi et al. 2002).

Die klassische Hypokalzämie der Milchkuh führt zu einer Hypophosphatämie, einerseits verursacht durch den P-verlust im Kolostrum, andererseits durch ungenügende Aufnahme mit der Nahrung, ungenügende Mobilisation aus dem Knochen und Phosphodiurese, ausgelöst durch hohe Konzentrationen des PTH. Weshalb es bei der Hypokalzämie zu einer Hypermagnesiämie kommt, ist nicht ganz klar. Man vermutet entweder einen kompensatorischen Mechanismus, um die systemische Anionen-Kationen-Balance aufrecht zu erhalten, oder aber es kommt zu einer abgeschwächten Magnesiumausscheidung aufgrund reduzierter Nierendurchblutung während der Hypokalzämie (Oetzel 1988).

Für das Schaf ist eine chronische alimentäre Fehlversorgung mit unzureichender Ca-Speicherung im Skelettsystem und ungenügende regulatorische Anpassung an plötzlich gesteigerten Ca-Bedarf entscheidend. Chronische alimentäre Fehlversorgung entsteht vor allem durch zu niedriges Ca-Angebot in der Gesamtration, wie sie bei Frühjahrsweide und unzureichendem Mineralstoffangebot vorkommen kann. Ältere Tiere reagieren empfindlicher auf alimentäre Unterversorgung, da ihre enterale Ca-Absorption herabgesetzt ist. Mangelhafte Auffüllung der Ca-Skelettspeicher bei tragenden Muttertieren führt zu ungenügender Anpassung an Situationen erhöhten Bedarfes, wie sie vor allem bei der Mineralisation der Fetenskelette und der Milchbildung gegeben sind. Zwischen dem 120. Trächtigkeits- und dem 25. Laktationstag kann der hohe Ca-Bedarf nicht mehr durch alimentäre Aufnahme gedeckt werden, so dass bei dieser physiologisch negativen Ca-Bilanz die Ca-Homöostase im Blut nur durch hormonell geregelte Ca-Mobilisierung aus dem Knochen aufrecht erhalten werden kann. In dieser Zeit wird deshalb oft eine Hypokalzämie beim Schaf beobachtet (Behrens 2001).

Über die klinische Pathologie speziell bei der Ziege werden in der Literatur keine Abgaben gemacht.

4.4.7 Behandlung und Prävention

Die meisten Milchkuhe reagieren sehr schnell auf eine einzelne Verabreichung von 500 ml einer 23-prozentigen Ca-Glukonatlösung, welche unter Kontrolle der Herzaktivität intravenös verabreicht wird. Diese Lösung beinhaltet 10,8 g Ca, welches genügen sollte, ein ungefähres Defizit von 6 g bei einer Milchkuh mit Hypokalzämie zu korrigieren. Eine subkutane Verabreichung derselben Menge Ca kann bei einer Milchkuh im Stadium I genügen (Oetzel 1988).

Adulten Schafen und Ziegen mit Hypokalzämie werden 50 bis 100 ml einer 23-prozentigen Ca-Glukonatlösung, ebenfalls unter Kontrolle der Herzaktivität, intravenös verabreicht (Guss 1977). Sobald Arrhythmie auftritt, sollte die Infusion verlangsamt oder gestoppt werden (Seyedmehdi et al. 2002). Tiere in Seitenlage sollten sternal gelagert werden. Ist es bereits zu ischämischen Muskelnekrosen gekommen, bleiben die Tiere liegen, auch nach eigentlich erfolgreicher Behandlung (Oetzel 1988).

Eine solche Ca-Verabreichung genügt jedoch nur kurzzeitig, um dem Tier durch die akute hypokalzämische Krise zu helfen. Die vollständige Wiederherstellung der Ca-Homöostase nimmt bei der Milchkuh zwei bis drei Tage in Anspruch (Littledike et al. 1981), solange bis sich die Ca-Absorptionsmechanismen im Darm und Knochen adaptieren konnten (Horst et al. 2003). Zudem stoppt die Behandlung der Milchkuh die negative Ca-Bilanz, welche normalerweise in der frühen Laktation für mehrere Monate besteht, nicht (Oetzel 1988). Beim Schaf sollte sich der Ca-Blutspiegel spätestens nach vier Tagen normalisieren (Behrens 2001). Hier besteht während der ersten 38 Tage der Laktation ebenfalls eine negative Ca-Bilanz (Braithwaite et al. 1969). Über die Dauer der negativen Ca-Bilanz bei der Ziege werden in der Literatur keine Angaben gemacht. Die Hypophosphatämie, welche gleichzeitig vorliegen kann, korrigiert sich in der Regel von alleine, sobald genügend Ca zugeführt wurde. Sollte die Unterversorgung mit Phosphor bestehen bleiben, wird eine Phosphorinfusion verabreicht (Oetzel 1988).

Nach erfolgreicher Therapie verbessert sich der Bewusstseinszustand, die Herzfrequenz nimmt ab und die Herztöne sind wieder deutlich zu hören. Harn und Kot werden wieder abgesetzt (Allegretto et al. 1987).

Ungefähr 60 % der behandelten Tiere können bereits nach einer halben Stunde und 15 % innerhalb von 2 Stunden wieder stehen. 25 bis 40 % davon sollen aber innerhalb von 12 bis 48 Stunden einen Rückfall erleiden (Blood et al. 1983). Schafe, welche während der Hochträchtigkeit an Hypokalzämie erkranken, haben eine grössere Rezidivrate (Allen und Sansom 1986), weshalb die Tiere regelmässig kontrolliert werden müssen, um bei Rezidiven erneut zu therapieren.

Die wichtigste präventive Massnahme besteht im Fütterungsmanagement während der präpartalen Phase (Oetzel 1988). Wie bei der Milchkuh wird beim Schaf eine Fütterung angestrebt, welche wenig Ca und normale Mengen Phosphor enthält, um die aktive Ca-Resorption aus dem Darm (Martig 2002) und die Freisetzung aus dem Knochen via gesteigerter PTH-Synthese zu stimulieren (Sykes und Russel 2000). Damit ein solcher Effekt zum Tragen käme, dürften zum Beispiel Kühen nicht mehr als 20 g Ca pro Tier und Tag angeboten werden (Martig 2002). Nach der Geburt wird vermehrt Ca gefüttert, wodurch die Inzidenz der Hypokalzämie (der Milchkuh) reduziert werden kann. Bei sehr grossen Schafherden ist diese Massnahme für Einzeltiere allerdings kaum durchführbar, da deren Futteraufnahme nicht steuerbar ist (Sykes und Russel 2000).

Bei der Ziege werden zur Behandlung der Hypokalzämie 80-100 ml einer 20 %igen Ca-Lösung bevorzugt subcutan verabreicht, da die Tiere sehr anfällig auf Stress reagieren können (Matthews 1999).

Erfolgt als präventive Massnahme eine Behandlung mit Vit D, so sind der Zeitpunkt der Verabreichung und die Menge an Vit D entscheidend. Wird die Behandlung zu früh oder mit einer zu geringen Dosis (1-5 Mio IE) vorgenommen, kann sie erfolglos sein. Zu spät verabreichtes Vit D kann das Inzidenzrisiko einer Hypokalzämie erhöhen (Oetzel 1988). Zudem sollte wegen des toxischen Effektes (metastatische Kalzifizierung von Weichteilgeweben (Goff 2000) von Vit D nicht wiederholt behandelt werden (Oetzel 1988). Bei der Milchkuh werden 2-5 Tage vor dem erwarteten Kalbetermin 10 Mio IE Vitamin D intramuskulär verabreicht, wodurch die Resorption von Ca aus dem Darm erhöht werden kann (Martig 2002). Werden mehr als 10 Mio IE während der letzten 10 Tage einer Trächtigkeit verabreicht, kann sich dies toxisch auswirken (Horst et al. 2003).

Erhöhter Ca-Fluss in den Körper kann durch eine negative Kationen-Anionen-Bilanz ($\text{Na}^+ + \text{K}^+ - (\text{Cl}^- + \text{S}^-)$) herbeigeführt werden (Tagari und Brock 1991). Zugabe von Anionen induziert in der Kuh eine metabolische Azidose. Kommt es im Blut zu einer metabolischen Azidose, tritt als Gegenregulationsmassnahme eine vermehrte Kationenausschüttung (hauptsächlich Ca, 4-5 g/Tag aus dem Knochen in Kraft, um den gesunkenen pH zu regulieren (Goff 2000). Werden Kühe hingegen mit einer Ration mit hohem Kationen-Gehalt gefüttert, kommt es zu einer metabolischen Alkalose. Diese pH-Veränderung im Blut führt, wie in Abbildung 7 gezeigt, dazu, dass sich die Konformation des PTH-Rezeptors derart verändert, dass dieser nicht mehr effektiv seinen Liganden PTH binden kann. Dies führt bei der Kuh zu einer reduzierten Antwort auf Ca-Veränderungen (Goff 2000).

Ein Urin-pH von ungefähr 6,2-6,8 bei Holsteinkühen und 5,8-6,3 bei Jerseykühen in den letzten 2 Wochen der Trächtigkeit sollte angestrebt werden, um eine Hypokalzämie effektiv vorbeugen zu können (Goff 2000). Diese Strategie wird beim kleinen Wiederkäuer nicht praktiziert.

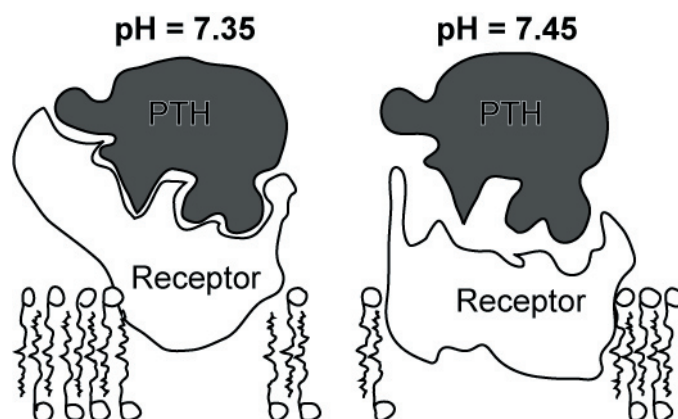


Abbildung 7: Effekt des Blut-pHs auf die PTH-Rezeptor-Konformation. Optimale Bindung des Rezeptors an sein Hormon unter physiologischen Blut-pH-Bedingungen (pH 7.35). Konformationsänderung des Rezeptors infolge Veränderung des Blut-pHs und nachfolgender unvollständigen Rezeptorbindung (Goff 2000).

4.4.8 Bedeutung von Vitamin D und von dessen Rezeptor bei der Hypokalzämie

Das gleichzeitige Vorhandensein einer Hypovitaminose D bei der Entstehung der Hypokalzämie ist bis jetzt nicht ganz geklärt, obwohl bekannt ist, dass der Vit D-Status saisonal fluktuiert und im Winter kritisch tiefe Werte erreichen kann, da Heu, welches länger gelagert wird, wenig Vit D enthält (Sykes und Russel 2000).

Bei nicht tragenden und nicht laktierenden Kühen beträgt die Vit D-Konzentration im Blut 5 bis 20 pg/ml (Horst et al. 1994). Während der späten Trächtigkeit erhöht sich dieser Wert durch verstärkte renale Synthese (Horst et al. 2003) auf 20 bis 50 pg/ml. Nach der Geburt und zu Beginn der Laktation steigt der Wert nochmals an, dann auf 100 bis 300 pg/ml bei massiven Hypokalzämien (Horst et al. 1994). Die Erhöhung der Vit D-Konzentration während der Laktation kommt einerseits durch verstärkte renale Synthese infolge erhöhtem PTH-Gehalt zustande, andererseits wird diese auch durch Prolaktin beeinflusst (Horst et al. 2003). Die biologische Aktivität von Vit D ist proportional der Anzahl VDR in den Zellen. Die aktive Ca-Absorption längs des Darmes wird durch Vit D vermittelt, weshalb eine ungenügende Vit D-Produktion zur Entwicklung einer Hypokalzämie beitragen kann. Die Effizienz der intestinalen Ca-Absorption ist während der Trächtigkeit und der Laktation erhöht (Horst et al. 1994). In dieser Zeit sind bei den meisten Spezies der PTH-Gehalt, der Vit D-Gehalt im Plasma und die Anzahl VDR erhöht, um die Ca-Absorption zu stimulieren. Die Aufregulierung der VDR während der Trächtigkeit scheint durch einen Faktor, der aus dem Uterus stammt, kontrolliert zu werden (Goff et al. 1991). Zu diesem Schluss kommen auch Horst et al. (1994), da Pseudoträchtigkeit bei Milchkühen (induziert durch Entfernen des Uterus und gleichzeitiges Belassen der Ovarien am Tag 9 einer Trächtigkeit) zu keiner VDR- Zunahme führt. Subkutane Verabreichung von 1,25-(OH)₂ Vit-D bei Jersey Kühen führte ebenfalls zu einer signifikanten Erhöhung der VDR (Naito et al. 1989). Zusätzlich hypertrophiert das Darmgewebe während dieser Zeit, was zu einer weiteren Steigerung der Absorptionsleistung führt (Horst et al. 1994). Bei Kühen mit und ohne Hypokalzämie sind die PTH- und Vit D-Konzentrationen im Plasma ähnlich, wobei angenommen wird, dass die Nieren einer Milchkuh, welche an Hypokalzämie erkrankt, zeitweise auf PTH-Stimulation refraktär zu sein scheinen (Goff et al. 1991).

Gemäss Goff et al. (1991) kommt es um den Geburtszeitpunkt bei Milchkühen zu einer Abnahme der VDR. Dies könnte ebenfalls ein weiterer Grund für das Entstehen einer Hypokalzämie sein. Die Autoren kommen zum Schluss, dass Plasma-Vit D-Werte indirekt proportional zur Ca-Konzentration im Plasma sind. Exogen zugefügtes Vit D kann selbst Einfluss auf die VDR-Menge nehmen. Einerseits quantitativ, als Vit D-abhängige Aufregulation, andererseits qualitativ via posttranslationaler Phosphorylierung der VDR (Horst et al. 1994). In vivo-Infusionen mit exogen zugefügtem Vit D bei Ratten und Jersey-Kühen (Naito et al. 1989) ergaben jeweils eine Aufregulierung der VDR. Diese Resultate erklären, in welcher Weise exogen zugefügtes Vit D hilft, eine Hypokalzämie zu verhindern

(Horst et al. 1994).

Mit zunehmendem Alter steigt beim Rind die Milchproduktion (Horst et al. 1997b), was zu einem erhöhten Ca-Bedarf führt. Parallel dazu sinkt die Anzahl VDR, wodurch das betreffende Gewebe weniger effizient auf Vit D reagieren kann (Goff et al. 1991). Es wurde zudem gezeigt, dass mit zunehmendem Alter das Enzym C-24-Hydroxylase, welches Vit D inaktiviert, stark zunimmt (Johnson et al. 1995). Knochen von älteren Ratten enthalten weniger VDR als diejenigen von jungen Ratten (Horst et al. 1994). Osteoblasten, welche als einzige Knochenzellen den VDR exprimieren, nehmen mit zunehmendem Alter in ihrer Anzahl ab, was zu einer Abnahme der VDR im Knochen führt (Horst et al. 1994), wodurch wiederum noch schlechter auf PTH- und Vit D-Signale reagiert werden kann (Goff et al. 1991). Resultat dieser altersbedingten Veränderung ist eine reduzierte Auffüllung des Plasma-Ca-Pools (Goff et al. 1991).

Die Wirkung von Vit D und PTH ist ferner von Magnesium abhängig, d.h. reduziert bei tiefen Plasma-Magnesiumwerten. Deshalb ist Hypokalzämie auch ein charakteristisches Zeichen eines späten Hypomagnesiämiestadiums (Sykes und Russel 2000).

Schröder et al. (1995) stellten bei Untersuchungen an heranwachsenden männlichen Ziegen, welche Ca- und/oder Phosphor-arm ernährt wurden, fest, dass die höchste Bindungskapazität B_{\max} des VDRs im Jejunum besteht.

Bei jungen, noch wachsenden Schafen stellten Braithwaite et al. (1969) mit zunehmendem Alter eine abnehmende Ca-Resorption fest. Bei jungen, rein mit Milch ernährten Tieren kann generell eine Ca-Resorption von 100 % erwartet werden. Diese war bei 2 bis 3 Monate alten Schafen auf 40 % gesunken und lag bei 9 Monate alten Schafen bei 36 %.

Es konnte gezeigt werden, dass bei Ziegen und Schafen zu Beginn der Laktation die Vit D-Konzentrationen, wie bei Milchkühen, signifikant ansteigen (Liesegang et al. 2005).

4.5 Vitamin D-Rezeptor

4.5.1 Lokalisation, Molekulargewicht und Vorkommen

Der VDR gehört zur Familie der Steroidhormonrezeptoren und des weiteren zur v-erb-A-Familie der Ligand-aktivierten Transkriptionsfaktoren. Das bedeutet, dass Vit D via Rezeptor die Transkription seiner Zielgene reguliert und dadurch eine grosse Breite verschiedener Zellfunktionen moduliert (Scheidt 2004).

Grundsätzlich kommt der Rezeptor in zwei verschiedenen Formen vor: Aktiviert und inaktiviert (= nicht besetzt). Die aktivierte Form wurde hauptsächlich in den Nuclei der Darmschleimhaut

als ein chromosomales Protein, welches spezifisch Vit D bindet, entdeckt (Barsony et al. 1997). Die genaue Verteilung des nicht aktivierten Rezeptors wird kontrovers diskutiert (Scheidt 2004). Man nimmt jedoch an, dass der VDR, wie Steroidhormonrezeptoren, ein locker gebundenes chromosomales Protein ist. Diese lockere Verbindung wird durch Anlagerung des Vit Ds an seinen Rezeptor verstärkt. Vorstellbar ist auch, dass es im Zytoplasma einen gewissen Anteil nicht besetzter Rezeptoren gibt, welche sich mit den unbesetzten Rezeptoren im Kern im Gleichgewicht befinden (Horst et al. 2003). Gemäss Barsony et al. (1997) wurden beim Menschen mittels fluoreszierenden Liganden (4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-calcitriol) eine gewisse Menge VDR im Zytoplasma kultivierter Fibroblasten gefunden. Genauer betrachtet befanden sich die Rezeptoren im endoplasmatischen Reticulum, im Golgi-Komplex und in den Mikrotubuli. Über die genaue Funktion des zytoplasmatischen Rezeptors ist man sich nicht ganz im Klaren. Möglich wäre jedoch, dass dieser Rezeptor nicht genomische (extranukleäre) Aufgaben übernimmt, zum Beispiel eine schnelle Erhöhung des intrazellulären cGMP.

Der VDR besitzt – je nach Spezies- ein Molekulargewicht zwischen 48 kDa und 60 kDa (Maus 54,5 kDa, Ratte 54 kDa, Affe 52 kDa, Rind 48 kDa und Mensch 52 kDa) (Bronner 1987). Er bindet mit einer sehr hohen Affinität ($K_d = 10^{-11}M$) und sehr hoher Selektivität Vitamin D (Horst et al. 2003).

Mittlerweile ist bekannt, dass der VDR neben dem Darm in weiteren Organen vorkommt, so zum Beispiel in der Nebenschilddrüse, in den β -Zellen des Pankreas, in der Hypophyse, im Ovar, in den Sertolizellen der Tubuli seminiferi des Hodens, im Gesäuge, in der Plazenta, im Uterus und in der Haut. Des weiteren konnte er in Brustkrebszellen, Melanomzellen, Lymphozyten des Menschen und in Osteosarkomzellen der Ratte nachgewiesen werden (Horst et al. 2003).

4.5.2 Struktur und Funktion des Vitamin D-Rezeptors

Der VDR ist ein saures Protein, welches am COOH-Ende eine Hormonbindungsdomäne und am NH₂-Ende eine DNA-Bindungsdomäne aufweist. Da der Rezeptor nicht sehr stabil ist, zerfallen beide Bindungsstellen zeit- und temperaturabhängig (Horst et al. 2003). Die stark konservierte DNA-Bindungsdomäne besteht aus zwei Zinkfingern. Das bedeutet, aus einer charakteristischen Aminosäuresequenz, in deren Abschnitt des Rezeptors sich zwei Strukturen befinden, die durch Anhäufungen der Aminosäuren Cystein gekennzeichnet sind. Siehe dazu Abbildung 8. Jeweils 4 Cysteinmoleküle, die durch ein Zinkatom fixiert sind, bilden den Grundstock für diese fingerähnliche Aminosäureschleife (Kaune 2000). Diese Zinkfinger werden durch ein Protein verdeckt.

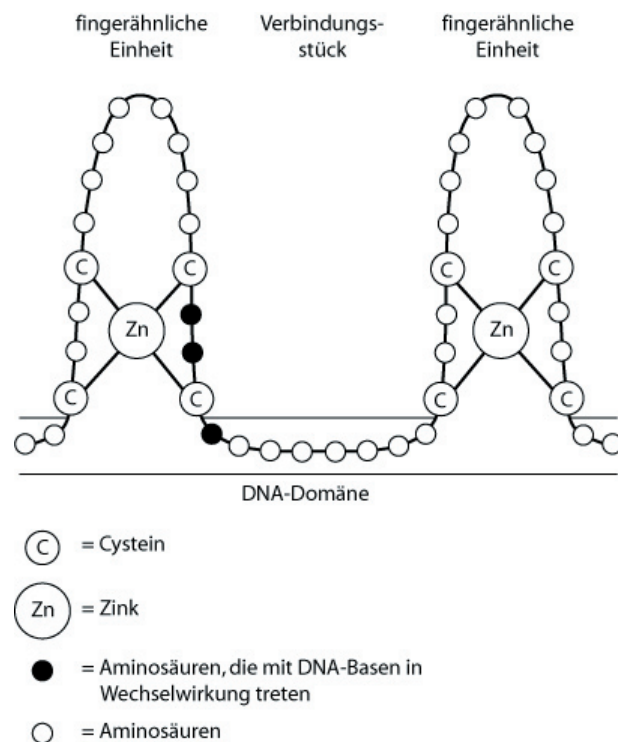


Abbildung 8: DNA-Domäne des Vitamin-D-Rezeptors mit ihren Zinkfingern (Kaune 2000).

Beim Huhn existiert der Rezeptor in einer grösseren (60,3 kDa) und in einer kleineren (58,6 kDa) Form (Bronner 1987). Von der kleineren Form wird angenommen, dass sie artifizuell als Resultat eines Abspaltungsprozesses entsteht (Haussler und Norman 1969). Diese Annahme stützt sich vor allem auf Beobachtungen von Allegretto et al. (1987), welche beschreiben, dass der VDR empfindlich auf endogene und exogene Proteasen mit Degradation reagiert.

Vit D zirkuliert im Blut vorwiegend gebunden an das Vit D-bindende Protein (DBP). Weniger als 5 % des Hormones liegen darin in freier Form vor. Diese freie Form tritt durch einfache Diffusion (Nelson und Cox 2001) in die Zellen ein und verbindet sich dort mit dem VDR. Dieser Komplex wird anschliessend phosphoryliert. Zudem kommt es zu einer Abspaltung des Proteins, welches die Zinkfinger des Rezeptors verdeckt. Dadurch können sich diese mit einem nukleären Hilfsfaktor verbinden, welcher auch Retinoid-X-Rezeptor (RXR) genannt wird (Reichrath et al. 2000). Zusammen bilden sie ein VDR/RXR-Heterodimer. Dieses wiederum hat eine hohe Affinität zu einer spezifischen regulatorischen Sequenz der DNA, dem Vitamin-D-Response-Element (VDRE), welches allen Vit D abhängigen Genen vorgelagert ist. Das VDRE besteht stets aus zwei Abschnitten von jeweils sechs Nukleotiden, die in gleicher Orientierung oder Palindromanordnung, entweder ununterbrochen hintereinander liegen oder durch drei weitere Nucleotide getrennt sind. Das Andocken des VDR/RXR-Heterodimers an das VDRE bewirkt wiederum das Binden der RNA-Polymerase an diesen Komplex und in der Folge die Transkription der Vit D-abhängigen Gene (Nelson und Cox 2001).

Letztendlich verursacht Vit D also eine erhöhte Syntheserate bestimmter Proteine. Dies sind unter anderem: 24-Hydroxylase, Alkalische Phosphatase, Calbindin, Osteocalcin, Ca^{2+} -ATPase (Ca-Pumpe) und VDR (Hausssler et al. 1995). Es handelt sich vorwiegend um Proteine, die für die Erhaltung der Ca-Homöostase in den klassischen Zielgeweben Darm, Knochen und Niere zuständig sind (Hausssler 1986).

Durch die Vermittlung der VDR werden die Zelldifferenzierung erhöht sowie die Zellproliferation und die Kollagensynthese gehemmt (Hausssler et al. 1995). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Vit D die Tumornekrosefaktor-induzierte Zytotoxizität auf humane Malignomzellen potenziert und dass Calcitriol in verschiedenen Tumorzellen Apoptose induzieren kann. Des weiteren stimuliert Vit D die Makrophagendifferenzierung, verändert die T-Lymphozytenaktivität und beeinflusst die Sekretion einer gewissen Anzahl von Peptidhormonen, wie z.B. Prolactin und Insulin (Horst et al. 2003).

4.5.3 Bisherige Untersuchungen zum Vorkommen und zur Verteilung von Vitamin D-Rezeptoren bei verschiedenen Tierarten und beim Menschen

4.5.3.1 Vitamin D-Rezeptoren beim Huhn

Clemens et al. (1988) wiesen im fixierten Hühnerdarm mittels Immunzytologie den VDR nach. Die stärkste Reaktion wurde in den Nuclei der Epithelzellen beobachtet, in grösseren Mengen in denen der Krypten als in denen der Zotten. In Hepatozyten war die Reaktion gering oder vollständig fehlend. Von den Autoren wurde vermutet, dass die Expression des VDR mit der Zelldifferenzierung korreliert sein könnte. Pike und Hausssler (1979) zeigten mittels einer Polyacrylamidgelelektrophorese von 10 µg gereinigtem Rezeptor die Anwesenheit eines grösseren Moleküls und von drei weiteren kleineren Proteinen mit einem Molekulargewicht zwischen 50 kDa und 65 kDa. Bei diesen Proteinen handelt es sich um sehr labile Verbindungen. Insbesondere während der Reinigung kann es zur Degradation des Rezeptors kommen. Die Isolation dieser Proteine erfordert eine starke Anreicherung, da diese im Zytosol selten vorkommen. Nur 0.001 % der totalen Zytosolproteinmenge besteht aus dem Rezeptor.

4.5.3.2 Vitamin D-Rezeptoren beim Menschen

Das Vorkommen und die Häufigkeit des aus 427 Aminosäuren bestehenden VDR des Menschen (Neibergs et al. 1996) ist von besonderem Interesse, da angenommen wird, dass Vit D und somit auch sein Rezeptor in Form eines anti-mitotischen Effektes antikanzerogene Eigenschaften aufweisen (Cross et al. 2001). Die Stärke dieses Effektes ist in erster Linie

von der Menge des exprimierten VDRs abhängig.

So wurden von Cross et al. (2001) im Gewebe von kolorektalen Karzinomzellen mittels RT-PCR, Western Blot und immunhistochemischen Untersuchungen Zellen entdeckt, welche nicht nur den VDR exprimieren, sondern auch eine 25-Hydroxy-Vit D-1 α -Hydroxylase Aktivität aufweisen. Durch letztgenannten Mechanismus sind die Tumorzellen befähigt, ihren spezifischen Liganden, das Vit D selbst zu produzieren. Der VDR ist hauptsächlich im Zytosol lokalisiert und nach Bindung mit dem Liganden wird er schnell in den Nucleus verlagert.

In einem frühen Kanzerogenesestadium nimmt die Expression des Genes, welches für VDR codiert, mit anhaltender Dedifferenzierung zu. Parallel dazu nimmt auch die VDR Menge zu. Hingegen kann in einem späteren Stadium mit schlecht differenzierten Karzinomen deutlich weniger der entsprechenden mRNA gefunden werden. Dies zeigt, dass durch die Auf-Regulierung des intrinsischen Vit D-/VDR-Systems, welches den antimitotischen Effekt der Steroidhormone vermittelt, kolorektale Tumorzellen anscheinend in der Lage sind, ihr eigenes Potential der autokrinen regulatorischen Antwort auf das Wachstum neoplastischer Zellen, vor allem in einem frühen Stadium der Kanzerogenese zu erhöhen (Cross et al. 2001).

4.5.3.3 Vitamin D-Rezeptoren beim Schwein

Pierce et al. (1987) führten Immunopräzipitations- und Immunoblottingversuche am Schweinedarm durch. Dabei wurde Dünndarm eines einzigen, noch nicht ausgewachsenen, 20 kg schweren Schweines verwendet. Mit den gegen VDR gerichteten monoklonalen Antikörpern IVG8C11 und XVIE6E6G10, welche zwei verschiedene Epitope des Rezeptors erkennen, gelang ihnen sowohl im nukleären als auch im Ganzzellextrakt der Bindungsnachweis an zwei verschiedene Epitope des VDR. Eindimensionale Immunoblots von nukleären und Ganzzellextrakten zeigten den Rezeptor als einheitliches Polypeptid mit einem Molekulargewicht von ca. 55 kDa. Durch zweidimensionale Immunoblots konnten dagegen zwei Rezeptorproteine dargestellt werden, beide mit einem Molekulargewicht von jeweils 55 kDa. Sie unterschieden sich jedoch im isoelektrischen Punkt. Beim einen belief sich dieser auf 6,1. Damit war er ähnlich wie der pI des VDRs beim Huhn. Beim anderen wurde ein pI von 5,9 festgestellt. Die beiden Rezeptorproteine sind entweder modifizierte Versionen desselben Proteins oder verschiedene Proteine, welche übereinstimmende Antigenitäten aufweisen. Des weiteren wurde mittels ¹²⁵I-IVG8C11 im Ganzzellextrakt ein kleineres Protein mit einem Molekulargewicht von 43 kDa gefunden. Bei diesem deutlich leichteren Protein könnte es sich um eine durch Spaltung des Proteins verkleinerte Form des Rezeptors handeln. Ferner könnte es auch sein, dass dieses leichtere Protein die funktionelle Form des Rezeptors darstellt.

4.5.3.4 Vitamin D-Rezeptoren bei der Ratte

Messbare VDR-Mengen wurden bei der Ratte in folgenden Organen ermittelt: Darm, Magen, Niere, Knochen, Schilddrüse, Nebenschilddrüse, Haut, Leber, Milz, Herz und Lunge. Im proximalen Dünndarm und im Colon wurden mit über 1000 fmol/mg Gesamtprotein die grössten Mengen gefunden. Ileum und Nieren wiesen nur die Hälfte bzw. ein Viertel dieser Menge auf. Die übrigen Gewebe enthielten zwischen 20 und 80 fmol/mg VDR (Sandgren et al. 1991).

Hirst und Feldman (1986) wiesen im Darm der Ratte zwei verschiedene Formen des Rezeptors nach. Bei der grösseren davon (56 kDa) handelte es sich um den intakten Rezeptor, welcher eine DNA-Bindungsdomäne aufweist. Die kleinere Form (47 kDa) besass die Eigenschaft der DNA-Bindung nicht. Der Verlust der DNA-Bindungsdomäne kam durch das Einwirken endogener Proteasen zustande, welche sich vermutlich in Lysosomen befinden (Hirst und Feldman 1986). Goff et al. (1990a) bestätigen das Vorhandensein relativ grosser Mengen von Trypsin im Darm der Ratte. Deshalb wird von den Autoren empfohlen, den verwendeten Puffern Sojabohnentrypsininhibitor beizugeben, da sonst die in den Assays gemessenen VDR Mengen häufig fehlerhaft zu niedrig ausfallen.

Dieselbe Arbeitsgruppe zeigte, dass durch per Injektion zugeführtes Vit D die Anzahl VDR im Darm zunahm. Im Duodenum war dieser Effekt statistisch signifikant. Die Vit D-Konzentration im Plasma erhöhte sich dabei um das 3- bis 5-fache. Zu keiner Zunahme der VDR kam es im Darm durch endogen synthetisiertes Vit D. Die vermehrte Synthese wurde bei diesem Versuch durch eine Ca-reduzierte Fütterung herbeigeführt (Goff et al. 1990b).

Wiese et al. (1992) führten Untersuchungen an frisch abgesetzten männlichen Holtzman-Ratten zur Bestimmung der VDR-Halbwertszeit durch. Dabei belief sich die HWZ für den Rezeptor in Abwesenheit von Vit D auf 4 Stunden. In Anwesenheit von Vit D erhöhte sich die HWZ auf mindestens 8 Stunden. Ausserdem ergaben die Untersuchungen der Autoren, dass sich die VDR-mRNA-Menge im Duodenum bei Vit D-mangelernährten Tieren nach einer Injektion von Vit D nicht erhöhte. Aus diesen Resultaten wurde geschlossen, dass die Erhöhung der VDR, ausgelöst durch eine Vit D-Injektion, durch eine Verlängerung der Lebenszeit der Rezeptoren zustandekommt und nicht durch eine vermehrte Transkription. Eine Ligand-induzierte Stabilisation des Rezeptors wird vermutet.

Die Anzahl VDR unterliegt mancherlei physiologisch bedingten Schwankungen. Wichtigste Parameter sind Alter, Trächtigkeit und Laktation. Nicht nur die VDR-Synthese ist beeinflussbar durch das Differenzierungsstadium der Zielzelle, sondern in vivo korrelieren sowohl die Menge als auch die Affinität des VDR mit dem Differenzierungsstadium von Keratinozyten (Zineb et al. 1998).

Liel et al. (1999) zeigten in ihrer Arbeit am Rattendarm den Zusammenhang zwischen

Östrogenmangel und reduzierter VDR Expression auf. Reduzierter Östrogengehalt beim alternden Tier führt durch eine reduzierte VDR-Synthese zu einer geringeren Ca-Absorption im Darm. Dieser Mechanismus wiederum könnte, gemäss Liel et al. (1999), in einem Zusammenhang mit der Entstehung der Osteoporose bei der Frau stehen.

4.5.3.5 Vitamin D-Rezeptoren beim Rind

Der VDR des Rindes besteht aus 424 Aminosäuren (Neibergs et al. 1996), 3 Aminosäuren weniger als beim Menschen. Durch die Durchführung eines BLAST (basic local alignment search tool) wurden folgende Erkenntnisse bezüglich des VDR zusammengetragen: Die bovine VDR-cDNA ist zu 99 % homolog mit der des menschlichen VDR, 85 % homolog mit der der Ratte, zu 86 % homolog mit der der Maus und zu 81 % homolog mit der des Vogels (Neibergs et al. 1996). Seine Grösse beläuft sich auf 48 kD (eigene Berechnung mittels BLAST).

Die grösste Ähnlichkeit zwischen dem bovinen und dem menschlichen VDR besteht im Bereich der ersten 1064 Basenpaare, welche die DNA-Bindungsdomäne und die Liganden-Bindungsdomäne beinhalten. Diese Domänen sind bei Ratte und Vogel bis auf 3 Aminosäuren, zu 100 % konserviert (Neibergs et al. 1996).

5 Tiere, Material und Methoden

5.1 Probengewinnung

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proben stammen einerseits von Schlachttieren, welche am Tierspital Zürich über einen Zeitraum von 2 Jahren geschlachtet wurden. Es wurden jeweils 5 juvenile und 5 adulte Schafe und Ziegen in je eine Gruppe aufgenommen. Bei den adulten Tieren handelte es sich um nicht tragende und nicht laktierende Tiere. Aus den topographischen Angaben in der Literaturübersicht ist zu entnehmen, dass es unmöglich ist am lebenden Tier mittels einfacher Methoden Duodenumbiopsien zu entnehmen. Deshalb wurden über einen Zeitraum von einem halben Jahr unter endoskopischer Kontrolle bei 11 3-jährigen Saanenziegen und 11 3-jährigen Ostfriesischen Milchschaften Biopsien der Schleimhaut des Colon descendens gesammelt. Die Biopsien wurden jeweils 40 cm kranial des Anus entnommen. Jedem Tier wurden einmalig im letzten Drittel der Trächtigkeit, 1 Woche postpartum (p.p), 4 Wochen p.p. und dann einmal monatlich jeweils während der Laktation zwei Biopsien entnommen. Siehe dazu Tabelle 2.

Tabelle 2: Zeitpunkt der Biopsieentnahmen.

Biopsie	Zeitpunkt
t1	Letztes Trächtigkeitsdrittel
t2	1 Wo p.p.
t3	4 Wo p.p. = 1 Mt
t4	8 Wo p.p. = 2 Mte
t5	12 Wo p.p. = 3 Mte
t6	16 Wo p.p. = 4 Mte
t7	20 Wo p.p. = 5 Mte

5.1.1 Probeentnahme bei Schlachttieren

Das Probematerial (siehe Tabellen 13 und 14 im Anhang) wurde innerhalb der ersten Stunde nach der Betäubung mit dem Bolzenschuss und dem Ausbluten der Tiere entnommen. Dabei wurden jeweils Darmquerschnitte von mehreren cm Länge der folgenden Darmabschnitte präpariert und zur Fixierung in 4%iges, neutral gepuffertes Formalin gegeben: Duodenum descendens, entnommen in der Mitte zwischen der Flexura cranialis und der Flexura caudalis (DD), Duodenum ascendens, in der Mitte zwischen der Flexura caudalis und der Flexura

duodenojejunalis (DA), Jejunum (JE), Ileum (IL), Cäkum (CC) und Colon descendens (CD). Die Colonproben wurden an der gleichen Stelle entnommen wie bei den Versuchstieren der Verlaufsstudie die Biopsieproben. Die Cäkumproben wurden jeweils als letzte Proben entnommen.

5.1.2 Darmbiopsieentnahme

Die Schleimhautbiopsieproben wurden unter Sichtkontrolle mit einem mit Biopsiezange ausgerüsteten Endoskop (PCF-20, Olympus) entnommen. Dabei wurde das Tier durch einen Helfer fixiert und das Endoskop 40 cm (Markierung an der Gummihülle des Gerätes) durch den Anus in den Dickdarm eingeführt. Es wurden pro Entnahmezeitpunkt (siehe Tabelle 2) jeweils 2 Proben von 1,5-2,0 mm Durchmesser entnommen und über 26 Stunden in neutral gepuffertem, 4%igem Formaldehyd fixiert. Die Tiere waren zu den am Morgen gewählten Entnahmezeitpunkten jeweils nüchtern.

5.2 Probenaufarbeitung

Alle Proben wurden im Anschluss an die 26 stündige Fixierung in 4 %igem und neutral gepufferten Formalin 24 h gewässert, in der aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in kleine Kassetten (Jet Kassetten®, Leica) gegeben. Zur weiteren Verarbeitung wurden die Jet-Kassetten in ein Gewebeinfiltrationsgerät (Leica TP 1020®) gestellt und die in Tabelle 3 aufgeführten Programmschritte wurden durchlaufen.

Anschliessend wurde das Gewebe mittels Paraffinausgiessstation (EG 1160®, Leica) in Paraffin eingebettet (Histowax®, Leica). Für das Herstellen von 5 µm dicken Paraffinschnitten wurde ein Rotationsmikrotom (RM 2165®, Leica) verwendet. Die Schnitte wurden auf Adhäsions-Objektträger (Superfrost® plus, Menzel-Gläser, Braunschweig) aufgezogen und während 30 min bei 60 ° Celsius im Wärmeschränk fixiert.

Tabelle 3: Protokoll der Entwässerung und Infiltration der Gewebeproben mit Paraffin.

Schlachtpräparate	Biopsien	Infiltration mit
4h	15min	70% Alkohol
4h	15min	70% Alkohol
4h	15min	96% Alkohol
4h	15min	96% Alkohol
4h	15min	100% Alkohol
4h	15min	100% Alkohol
4h	15min	Methylbenzoat
4h	15min	Methylbenzoat
4h	15min	Xylol
4h	15min	Xylol
4h	15min	Paraffin
4h	15min	Paraffin

5.3 Histologische und immunhistochemische Methoden

Zusätzlich zu den immunhistochemischen Färbungen wurden histologische Übersichtsfärbungen zur Orientierung und zur Beurteilung der Morphologie durchgeführt.

5.3.1 Übersichtsfärbung

Von jeder Gewebeprobe wurde an Paraplastschnitten eine Hämalaun-Eosin-Färbung (Hämalaun nach Mayer) durchgeführt (Böck 1989). Danach wurden die Schnitte automatisch eingedeckt. Dazu wurden ein Eindeckautomat (RCM 2000®, Medite) und ein xylollösliches Eindeckmedium verwendet (Pertex®, Medite).

5.3.2 Immunhistochemischer Nachweis

5.3.2.1 Grundprinzipien der Immunhistochemie

Mittels immunhistochemischer Verfahren können verschiedene Antigene auf mikroskopischen Präparaten ermittelt werden. Grundsätzlich wird die direkte von der indirekten Methode unterschieden.

Direkte Methode

Bei dieser Methode wird ein primärer Antikörper, konjugiert mit einem fluoreszierenden Agens oder einem Enzym (Peroxidase oder Alkalische Phosphatase) verwendet. Hierbei handelt es sich um ein sehr kurzes Protokoll, da sehr wenige Schritte benötigt werden, um zu einem Ergebnis zu gelangen. Ein grosser Nachteil und ein wichtiger Grund dafür, dass dieses Verfahren nicht sehr häufig angewendet wird, ist die geringe Signalverstärkung. Diese basiert auf der Tatsache, dass jeder Antikörper nur ein einziges Antigen binden kann. Daraus resultiert auch eine geringe Sensitivität, welche nicht geeignet ist, geringe Antigenmengen nachzuweisen (Boenisch 2003).

Indirekte Methode

Hier bindet ein unkonjugierter spezifischer Primärantikörper an das gesuchte Antigen auf dem Objektträger. In einem weiteren Schritt wird der Primärantikörper selbst zu einem Antigen, weil ein Sekundärantikörper hinzugegeben wird, welcher gegen den Primärantikörper gerichtet ist und somit an diesen bindet. Der Sekundärantikörper ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff oder einem Enzymmolekül konjugiert.

Die indirekte Nachweismethode besitzt eine grössere Sensitivität als die direkte, weil mehrere Sekundärantikörper an verschiedene Epitope eines Primärantikörpers binden können. Dadurch entsteht eine Signalverstärkung.

Es gibt viele verschiedene Variationen der indirekten Methode. Jede Variation hat wiederum bestimmte Vor- und Nachteile.

In dieser Studie wurde die sogenannte ABC-Variation (ABC=Avidin-Biotin-Complex) gewählt. Hier spielt die Affinität des Avidins zum Biotin die wichtigste Rolle. Der Primärantikörper wurde vom Hersteller bereits mit Biotin markiert (= biotinyliert). Nach der Bindung des biotinylierten Primärantikörpers an das gesuchte Antigen bindet in einem weiteren Schritt der Avidin-Biotin-Komplex, welcher mit einem Enzym (Merretichperoxidase) konjugiert ist, an das Biotin des Primärantikörpers. In einem letzten Schritt wird die Enzymaktivität via Chromogen nachgewiesen und somit Lokalisation und Menge des Antigens indirekt eruiert.

Chromogen-Reaktion

Als Chromogen für die Peroxidase wird 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) verwendet. Es bildet ein braunes Endprodukt, das in Alkohol und in anderen organischen Lösungsmitteln unlöslich ist. Durch die Merretichperoxidaseaktivität bildet sich in Anwesenheit des Elektronendonors DAB

ein Enzym-Substratkomplex, und anschliessend erfolgt die Oxidation des Elektronendonors. Der Elektronendonator ist die treibende Kraft der fortlaufenden Katalyse (Umsetzung von H_2O_2), sein Fehlen bewirkt einen Stillstand dieser Reaktion (Boenisch 2003).

5.3.2.2 Vitamin D-Rezeptornachweismethode

Während jeder immunhistochemischen Reaktion wurden Negativkontrollen mitgefärbt, bei denen der primäre Antikörper weggelassen wurde. Bei den Schlachttieren wurden als Negativkontrollen immer eine Probe des Duodenum descendens und eine Probe des Colon descendens mitgeführt. Als dritte Negativkontrolle wurde abwechselungsweise pro Durchgang eine Probe der weiteren vier Darmabschnitte verwendet.

Die Paraplastschnitte wurden zur Demaskierung der Antigenepitope der Hormonrezeptoren für 15 Minuten in der Mikrowelle bei 600 Watt in 0,01 M Citratpuffer, pH 6 wärmebehandelt (Shi et al. 1991).

Die 5 μm dicken Paraplastschnitte dienten dem Nachweis des Vit D-Rezeptors mit Hilfe des monoklonalen biotinylierten Antikörpers 9A7 γ (Firma Neomarkers). Dieser ist gegen VDR des Hühnerdarms entwickelt worden (Pike et al. 1982) und zeigt Kreuzreaktionen mit dem VDR von Ziege und Schaf. Als sekundäres Nachweissystem kam ein Streptavidin-Biotin-Meerrettichperoxidase-Komplex (StreptABComplex/HRP, K 0377, Firma DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) zum Einsatz. Anschliessend wurde die Lokalisation und die Menge der VDR mittels 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB+ Chromogen, K3468, Firma DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) sichtbar gemacht. Die einzelnen Reaktionsschritte sind im Anhang (Tabelle 12) beschrieben.

Als Positivkontrolle wurde Duodenum vom Schwein mitgeführt (Milde et al. 1989).

5.4 Auswertung der durchgeführten Reaktionen

5.4.1 Sichtung des Probenaufkommens und Auswahl für den immunhistochemischen Nachweis

Mit Hilfe der Hämalun-Eosin-Färbung wurde eine histomorphologische Untersuchung der Schnitte vorgenommen. Bei der Sichtung der Schnitte wurde neben der Morphologie der Gewebe auch auf die Qualität der Schnitte geachtet. Wichtiges Kriterium war die Erhaltung der intakten Darmschleimhaut.

5.4.2 Semiquantitative Ermittlung des Vitamin D-Rezeptorgehalts

Die Anfärbung der Kerne liess sich in fünf Stufen einteilen: „negativ“, „sehr schwach“, „schwach“, „mittel“ und „stark“. Im Mikroskop stellen sich die negativ angefärbten Kerne blau (Gegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer), die sehr schwach angefärbten grau bis beige, die schwach angefärbten hellbraun, die mittel angefärbten braun, die stark angefärbten dunkelbraun dar.

In je einem Schnitt pro Darmabschnitt wurden in den Krypten basal (BG= basal gland), intermediär (IG= intermed. Gland) und apikal (SG= superfiz. Gland) jeweils 500 Zellen ausgewertet. Im Oberflächenepithel (SE= superfizielles Epithel) wurden ebenfalls pro Schnitt 500 Zellen beurteilt. Nach dem Erfassen der Farbintensitäten und deren Häufigkeiten wurden diese zum immunreaktiven Score umgerechnet. Die Anzahl negativer Zellen wurde mit Null multipliziert, die der sehr schwach angefärbten mit 0,25, die der schwach angefärbten mit 1, die der mittel angefärbten mit 4 und die der stark angefärbten Zellen mit 9. Diese Einzelprodukte für den jeweiligen Gewebebezirk wurden dann zum immunreaktiven Score (Tabelle 4) addiert. Der immunreaktive Score setzt sich also aus der Summe der Einzelprodukte zusammen, die sich aus der Multiplikation des exponentiellen Umrechnungsfaktors für die Farbintensität mit der jeweiligen Anzahl gemessener Zellen ergeben (Kohtes 1998).

Tabelle 4: Immunreaktiver Score (IRS) in Abhängigkeit von der Anfärbung der Zellkerne.

IRS	Mittlere Anfärbung der Zellkerne
0	negativ
1 - 125	sehr schwach positiv
126 - 500	schwach positiv
501 - 2000	mittel positiv
2001 - 4500	stark positiv

Daraus ergibt sich, dass bei einem immunreaktiven Score von null alle Zellkerne negativ angefärbt waren, also kein Rezeptor nachgewiesen werden konnte. Lag der IRS zum Beispiel bei 3000, so war die durchschnittliche Färbintensität stark positiv. Dies bedeutet, dass ein grosser Teil der Zellkerne stark positiv angefärbt war, obwohl auch negativ, sehr schwach, schwach und mittelgradig positiv gefärbte Zellkerne vorkommen konnten.

5.5 Mikroskopische Ausrüstung und photographische Befunddokumentation

Für die lichtmikroskopische Untersuchung der histologischen und immunhistochemischen Präparate wurde ein binokulares Stereomikroskop (DMLB®, Leica, Schweiz) verwendet. Zum Fotografieren stand eine Digitalkamera (DC 480) der Firma Leica zur Verfügung.

5.6 Statistische Auswertung

Aus dem immunreaktiven Score jedes Darmabschnittes wurde der Mittelwert (= MW) und der Standardfehler (= SF) für jeden Darmabschnitt innerhalb einer Gruppe (Schafe/ Schaflämmer/ Ziegen/ Ziegenlämmer/biopsierte Tiere) berechnet. Mit diesen Werten wurde mittels des Stat-View-Programmes eine dreifaktorielle Varianzanalyse durchgeführt. Um allfällig auftretende Signifikanzen festzulegen wurde der Bonferroni-Test durchgeführt.

In einem weiteren Schritt wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson zwischen dem IRS im DD und dem CD für die Schlachtschafe und Schlachtziegen getrennt jeweils mit Hilfe des Systat-Programmes (Systat 8.0, Systat Software, Inc., Point Richmond, CA 94804-2028, USA) ermittelt. Basis dieser Berechnung waren die Orte mit höchstem IRS, d.h. es wurden dazu die Mittelwerte aus BG und IG herangezogen.

6 Ergebnisse

6.1 Immunhistochemischer Nachweis des Vitamin D-Rezeptors

Das Vorhandensein spezifischer Rezeptoren ist die Voraussetzung für die Bindung eines Hormons und die Vermittlung seiner Wirkung auf zellulärer Ebene. Der Vorteil des immunhistochemischen Nachweises besteht in der Möglichkeit einer eindeutigen topografischen Charakterisierung der rezeptortragenden Zellpopulationen im Gewebeverband (Kohtes 1998).

6.1.1 Nachweis von Vitamin D-Rezeptoren im Darm von Schlachtschafen

6.1.1.1 Einfluss des Alters auf die Menge an Vitamin-D-Rezeptoren

Die statistische Auswertung des immunreaktiven Scores der Schaflämmer und der adulten Schafe mittels 3-faktorieller Varianzanalyse ergab, dass der Faktor Alter keinen signifikanten Einfluss (F-Wert= 0,035; p-Wert= 0,86) hatte. Aus diesem Grund wurden die weiteren statistischen Berechnungen nicht getrennt nach Alter durchgeführt. Es erfolgte weiterhin auch keine getrennte Darstellung der Resultate von jungen und adulten Tieren.

6.1.1.2 Histomorphologische Beschreibung

Die Anfärbung der Kerne liess sich, wie bereits früher erwähnt, in fünf Stufen einteilen: „negativ“, „sehr schwach“, „schwach“, „mittel“ und „stark“. Im Mikroskop stellen sich die negativ angefärbten Kerne blau (Gegenfärbung mit Hämalalaun nach Mayer), die sehr schwach angefärbten grau bis beige, die schwach angefärbten hellbraun, die mittel angefärbten braun, die stark angefärbten dunkelbraun dar.

Im DD (Abbildung 9) zeigten die Enterozyten der basalen Drüsenabschnitte eine stark positive Farbreaktion. Diese nahm gegen apikal ab. Basal kamen neben stark positiv angefärbten Enterozytenzellkernen auch Kerne mit mittlerer und negativer Anfärbung vor. Schwach angefärbte Enterozytenkerne waren kaum vorzufinden. Das Zytoplasma der positiven Enterozyten zeigte mehrheitlich eine mittlere Anfärbung. Dieses Bild wiederholte sich in den mittleren Drüsenabschnitten im DD, wobei es zu einer Zunahme der negativen Zellen kam. Die oberflächlichen Drüsenabschnitte und das Oberflächenepithel des DD wiesen mehrheitlich schwach bis sehr schwach angefärbte Zellkerne auf. Das Zytoplasma zeigte sich an dieser Stelle schwach angefärbt.

Ein praktisch identisches Bild konnte auch im DA vorgefunden werden (Abbildung 10). Des-

halb wird an dieser Stelle nicht weiter darauf eingegangen.

Auch im JE (Abbildung 11) zeigten die basalen Drüsenabschnitte eine stärkere Anfärbung als weiter apikal gelegene Drüsenabschnitte. Basal kam es gegenüber dem Duodenum zu einer Zunahme der mittelgradig immunopositiven Enterozytenzellkerne, wohingegen die stark angefärbten Kerne in ihrer Anzahl abnahmen. Das Zytoplasma der Enterozyten zeigte sich mittelgradig angefärbt. In den mittleren Bereichen der JE-Schleimhaut kamen überwiegend mittlere und schwach angefärbte Enterozytenzellkerne vor. Im Zytoplasma war die Anfärbung schwach. In den obersten Drüsenabschnitten und im Oberflächenepithel wurden schwach und sehr schwach angefärbte Enterozytenzellkerne und ein schwach angefärbtes Zytoplasma vorgefunden.

Die Anfärbung im IL (Abbildung 12) zeigte insofern ein gleichmässigeres Bild, als eine Abschwächung der Immunreaktion gegen apikal nicht mehr nachzuweisen war. Die basalen Enterozytenzellkerne waren nur vereinzelt mittelgradig angefärbt. Mehrheitlich waren schwach bis sehr schwach immunoreaktive Kerne vorhanden. Negative Enterozytenzellkerne traten kaum auf. In den mittleren und oberflächlichen Drüsenabschnitten sowie im Oberflächenepithel zeigte sich ein ähnliches Bild: Vorwiegend schwach bis sehr schwach angefärbte Kerne, nur noch höchst vereinzelt solche mit mittlerer Farbintensität. Im ganzen IL präsentierte sich das Zytoplasma der Enterozyten als schwach angefärbt.

Bei der Betrachtung des CC (Abbildung 13) fiel auf, dass die Enterozyten der mittleren Drüsenabschnitte gegenüber den basalen und oberflächlichen Drüsenzellen sowie der Oberflächenepithelzellen vorwiegend mittelgradig angefärbte Zellkerne enthielten. In den zuletzt genannten Abschnitten kamen vorwiegend schwach bis sehr schwach angefärbte Zellkerne vor. Aufgrund der Zunahme von negativ reagierenden Becherzellen im Dickdarm war im CC das Zytoplasma insgesamt kaum angefärbt.

Dasselbe Bild der zytoplasmatischen Anfärbung zeigte sich im CD (Abbildung 14). Hier waren in den mittleren Drüsenbereichen, gegenüber den basalen und oberflächlichen Drüsenabschnitten ebenfalls einzelne mittel bis stark positive Enterozytenzellkerne zu erkennen. Die restlichen positiven Zellkerne wiesen eine überwiegend schwache bis sehr schwache Anfärbung auf. Dies war vor allem bei oberflächlichen Drüsenabschnitten und dem Oberflächenepithel zutreffend.

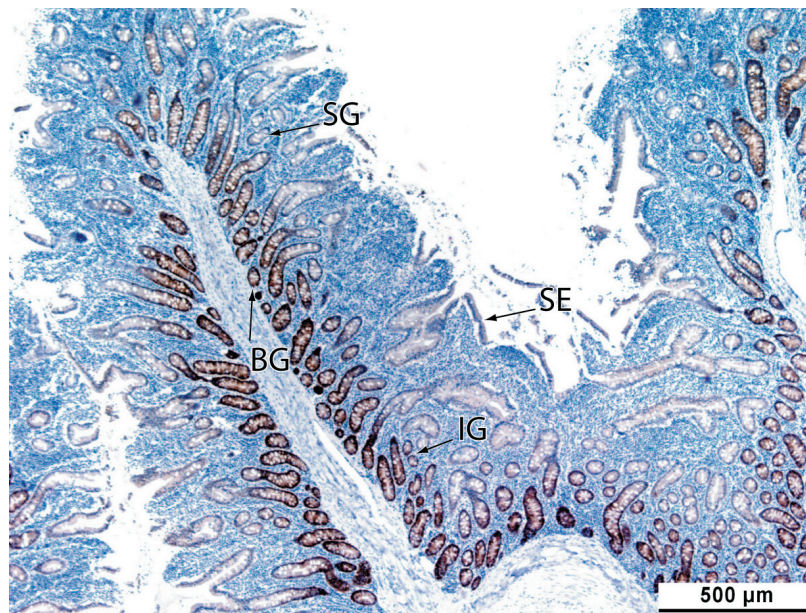


Abbildung 9: Immunhistochemischer Nachweis von Vitamin D-Rezeptoren im Duodenum descendens eines Schafes: Starke Immunreaktion in den basalen Drüsenabschnitten (BG) und Abnahme der Färbintensität zu den oberflächlichen Drüsenabschnitten (SG) und zum Oberflächenepithel (SE) hin. IG = intermediäre Drüsenabschnitte.

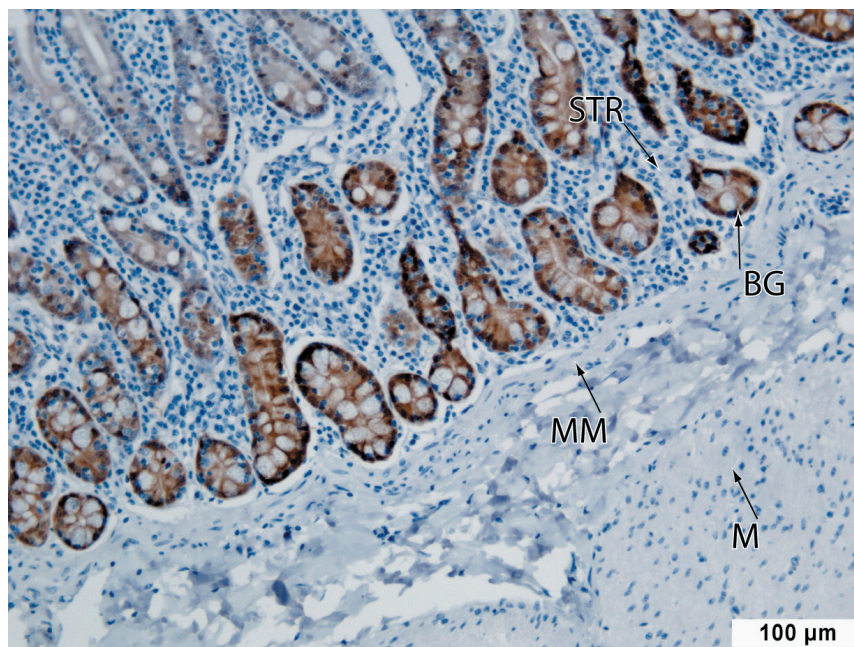


Abbildung 10: Immunhistochemischer Nachweis von Vitamin D-Rezeptoren im Duodenum ascendens eines Schafes: In den basalen Drüsenabschnitten (BG) ist eine überwiegend starke Anfärbung der Enterozytenzellkerne zu verzeichnen. Glatte Muskulatur und umgebendes Stroma (STR) reagieren nicht. M = Tunica muscularis, MM = Lamina muscularis mucosae.

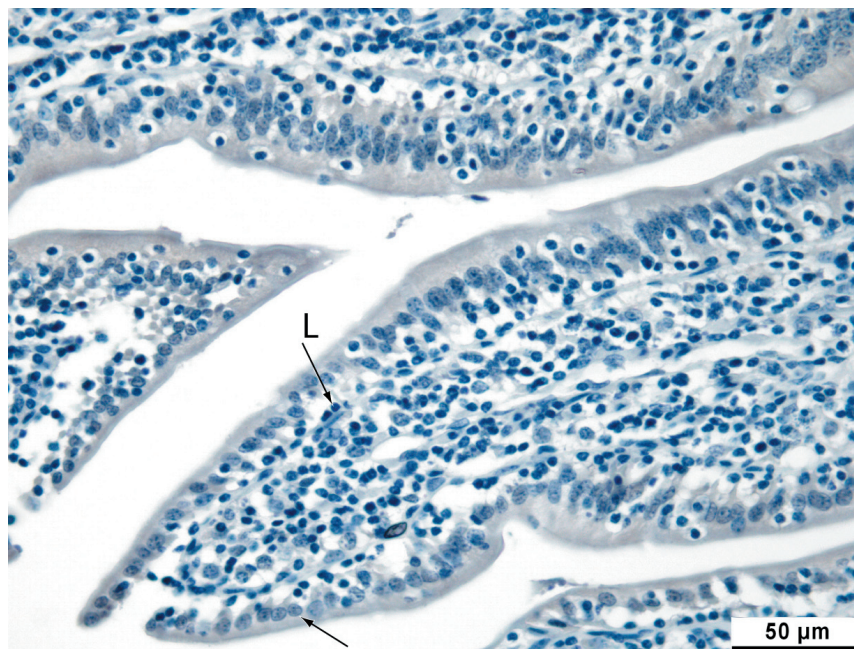


Abbildung 11: Immunhistochemischer Nachweis von Vitamin D-Rezeptoren im Jejunum eines Schafes: Das Oberflächenepithel der Zotten reagiert schwach bis sehr schwach positiv. Ferner liegt eine schwache zytoplasmatische Anfärbung vor. → = schwach positiver Enterozytenzellkern; L = VDR-negative lymphozytäre Zelle.

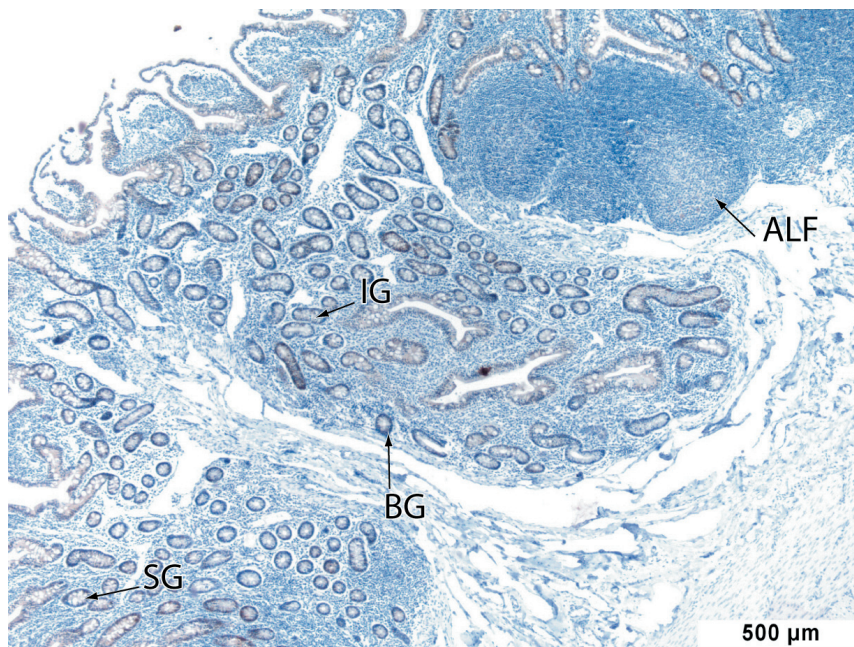


Abbildung 12: Immunhistochemischer Nachweis von Vitamin D-Rezeptoren im Ileum eines Schafes: Die basalen Drüsenabschnitte (BG) zeigen eine den anderen Drüsenabschnitten (IG, SG) ähnliche, schwache Immunreaktion. IG = intermediäre und SG = oberflächliche Drüsenabschnitte, ALF = Aggregat von Lymphfollikeln.

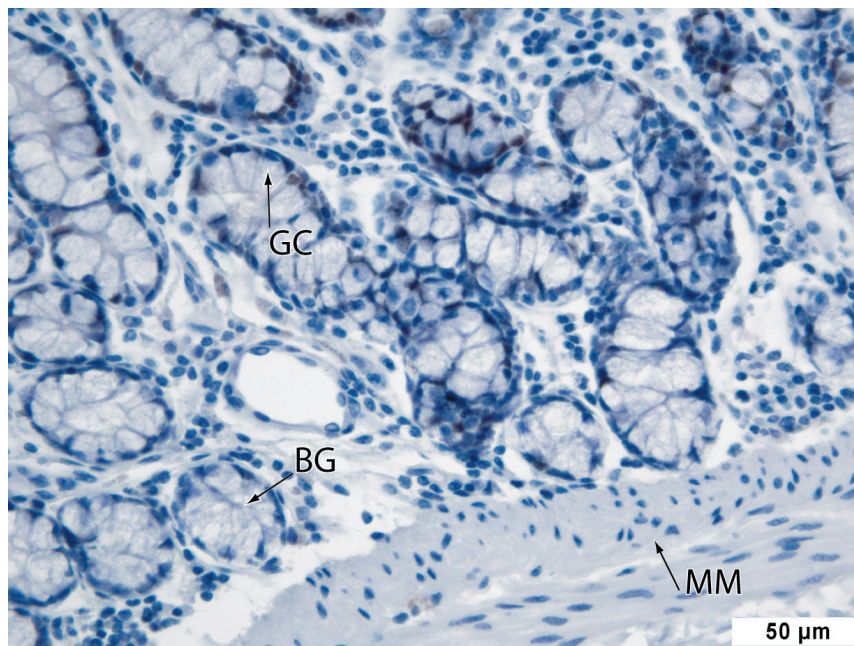


Abbildung 13: Immunhistochemischer Nachweis von Vitamin D-Rezeptoren im Cäkum eines Schafes: Basale Drüsenabschnitte (BG) zeigen eine schwache Anfärbung der Enterozytenzellkerne. Sehr viele Becherzellen (GC) weisen ein auffallend immuno-negatives Zytoplasma auf. MM = Lamina muscularis mcosae.

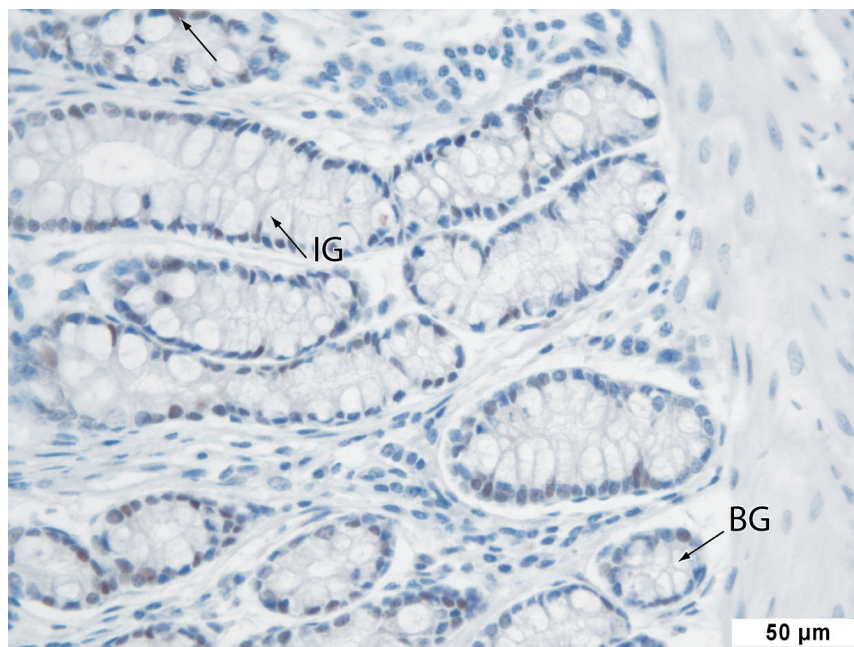


Abbildung 14: Immunhistochemischer Nachweis von Vitamin D-Rezeptoren im Colon descendens eines Schafes: Basale Drüsenabschnitte (BG) reagieren meist schwach positiv. Vereinzelt Enterozytenzellkerne (→), vorwiegend in den mittleren Drüsenabschnitten (IG), sind stark angefärbt.

6.1.1.3 Die einzelnen Darmabschnitte im Vergleich

In allen 6 Darmabschnitten war, wie in Abbildung 15 gezeigt, eine immunhistochemische Farbreaktion festzustellen. Dabei wurde die stärkste Farbreaktion in den verschiedenen Drüsenabschnitten des DD nachgewiesen (MW= 763; SF= 90). In diesem Darmabschnitt bestand kein signifikanter Unterschied zu DA (p-Wert = 0,30; MW= 675; SF= 80), welcher somit eine vergleichbar starke Reaktion zeigte. In allen weiteren Darmabschnitten wurden dagegen signifikant weniger Rezeptoren als im DD verzeichnet (p-Wert jeweils < 0,0001): DD: MW 763 (SF= 90) > JE: MW 414 (SF= 50) ; IL: MW 280 (SF= 45) ; CC: 270 (SF= 40); CD: MW 298 (SF= 34).

Ein ähnliches Resultat ergab sich im DA. Dieser Darmabschnitt (MW= 675; SF= 80) besass einen signifikant höheren Mittelwert als JE (MW 414; p=0,0026). Signifikante Unterschiede bestanden auch zwischen DA und IL, CC, CD (p< 0,0001). Zwischen JE und IL waren keine signifikanten Unterschiede feststellbar.

Die beiden Dickdarmabschnitte CC und CD unterschieden sich ebenfalls nicht signifikant voneinander (p= 0,74). Somit wurde demonstriert, dass die Reaktionsintensität im Duodenum am stärksten war und in aboraler Richtung abnahm. Im IL und anschliessendem Dickdarm wurde das schwächste Resultat erreicht.

Es bestanden folgende drei Gruppen von Darmabschnittenn mit jeweils abgestuften Intensitäten: DD/DA > JE > IL, CC, CD.

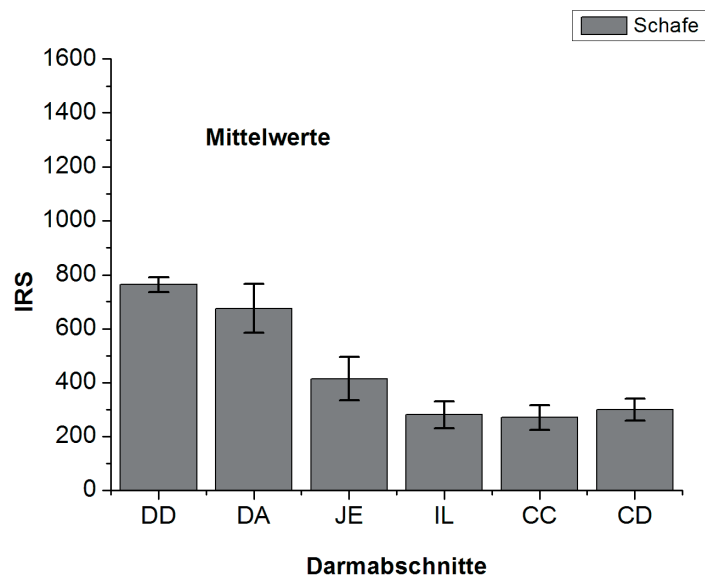


Abbildung 15: Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte des in verschiedenen Darmabschnitten bestimmten immunreaktiven Scores (IRS) bei Schlachtschafen.
DD = Duodenum descendens, DA = Duodenum ascendens, JE = Jejunum, IL = Ileum, CC = Cäkum, CD = Colon descendens.

6.1.1.4 Die einzelnen Darmabschnitte im Vergleich unter Einbindung der unterschiedlichen Schleimhautstellen

Wie in Abbildung 16 und Tabelle 5 gezeigt, war in den basalen Drüsenabschnitten (BG) des DD eine signifikant stärkere Farbreaktion als in den entsprechenden basalen Drüsenabschnitten des JE, IL, CC und CD vorhanden. Dasselbe Resultat wurde im DA erhalten. Zwischen den basalen Drüsenabschnitten des DD und DA bestand kein signifikanter Unterschied. Die basalen Drüsenabschnitte des JE zeigten einzig zu den basalen Drüsenabschnitten des CC einen signifikanten Unterschied.

Die Farbreaktion war in den intermediären Drüsenabschnitten des DD signifikant stärker als in den intermediären Drüsenabschnitten von JE, IL, CC und CD. Zwischen DD und DA war in den intermediären Drüsenabschnitten kein signifikanter Unterschied vorhanden. Die Werte im DA waren signifikant grösser als die entsprechenden Werte von IL und CC. Sowohl in den oberflächlichen Drüsenabschnitten als auch im Oberflächenepithel waren zwischen den verschiedenen Darmabschnitten keine signifikanten Unterschiede nachweisbar.

Im DD waren sowohl die Werte der basalen als auch die der intermediären Drüsenabschnitte signifikant grösser als diejenigen der oberflächlichen Drüsenabschnitte und des Oberflächenepithels (BG und IG > SG, SE). Siehe dazu Tabelle 6. Im DA gelangte man zu einem ähnlichen Ergebnis. Zusätzlich war der Wert der BG signifikant grösser als der der IG (BG > IG > SG, SE). Die Werte der basalen Drüsenabschnitte des JE waren signifikant grösser als diejenigen der oberflächlichen Drüsenabschnitte und des Oberflächenepithels

(BG > SG, SE). In demselben Darmabschnitt unterschieden sich die IRS der intermediären Drüsenabschnitte signifikant von denjenigen des Oberflächenepithels (IG > SE). Keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Drüsenabschnitten waren im IL und CC vorhanden. In den intermediären Drüsenabschnitten des CD waren signifikant mehr Rezeptoren angefärbt als im Oberflächenepithel desselben Darmabschnittes (IG > SE).

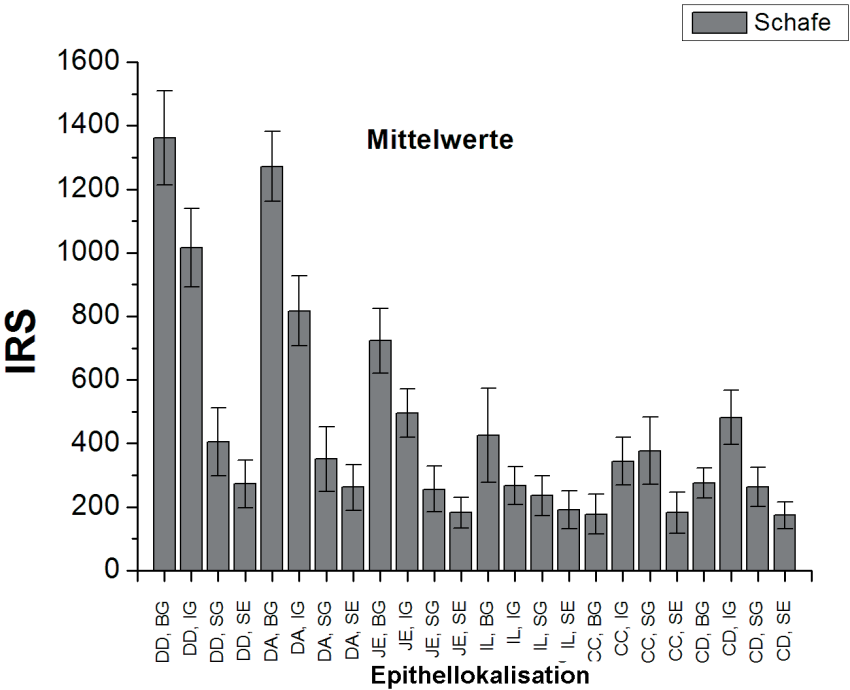


Abbildung 16: Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte des in verschiedenen Darmabschnitten bestimmten immunreaktiven Scores (IRS) bei Schlachtschafen in Bezug auf die Lokalisation in den Drüsen und im Oberflächenepithel. DD = Duodenum descendens, DA = Duodenum ascendens, JE = Jejunum, IL = Ileum, CC = Cäkum, CD = Colon descendens, BG = basale Drüsenabschnitte, IG = intermediäre Drüsenabschnitte, SG = oberflächliche Drüsenabschnitte, SE = Oberflächenepithel.

Tabelle 5: Signifikante Differenzen ($p < 0,05$) zwischen den einzelnen Drüsenregionen in Abhängigkeit vom Darmabschnitt beim Schaf. BG = basale Drüsenabschnitte, IG = intermediäre Drüsenabschnitte, SG = oberflächliche Drüsenabschnitte, SE = Oberflächenepithel.

BG:	DD > JE, IL, CC, CD
BG:	DA > JE, IL, CC, CD
BG:	JE > CC
IG:	DD > JE, IL, CC, CD
IG:	DA > IL, CC
SG:	keine Sign.
SE:	keine Sign.

Tabelle 6: Signifikante Differenzen ($p < 0,05$) zwischen den einzelnen Drüsenabschnitten und dem Oberflächenepithel in Abhängigkeit vom Darmabschnitt.
DD = Duodenum descendens, DA = Duodenum ascendens, JE = Jejunum, IL = Ileum, CC = Cäkum, CD = Colon descendens.

DD:	BG > SG, SE
DD:	IG > SG, SE
DA:	BG > IG, SG, SE
DA:	IG > SG, SE
JE:	BG > SG, SE
JE:	IG > SE
IL:	keine Sign.
CC:	keine Sign.
CD:	IG > SE

6.1.2 Nachweis von Vitamin D-Rezeptoren im Darm von Schlachtziegen

6.1.2.1 Einfluss des Alters auf die Anzahl Vitamin D-Rezeptoren

Die statistische Auswertung des immunreaktiven Scores der Ziegenlämmer und der adulten Ziegen mittels 3-faktorieller Varianzanalyse ergab, dass der Faktor Alter keinen signifikanten Einfluss (F-Wert= 0,004, p-Wert= 0,95) hatte. Aus diesem Grund wurden die weiteren statistischen Berechnungen nicht getrennt nach Alter durchgeführt. Es erfolgte weiterhin keine getrennte Darstellung der Resultate von jungen und adulten Tieren.

6.1.2.2 Histomorphologische Beschreibung

Da histomorphologisch nur geringgradige Unterschiede zwischen den Proben der Schafe und der Ziegen vorhanden waren wird hier nicht mehr näher auf die Histomorphologie der Ziegenpräparate eingegangen. Es folgen zum Vergleich Abbildungen aus dem DD (Abbildung 17), dem CC (Abbildung 18) und dem CD (Abbildung 19).

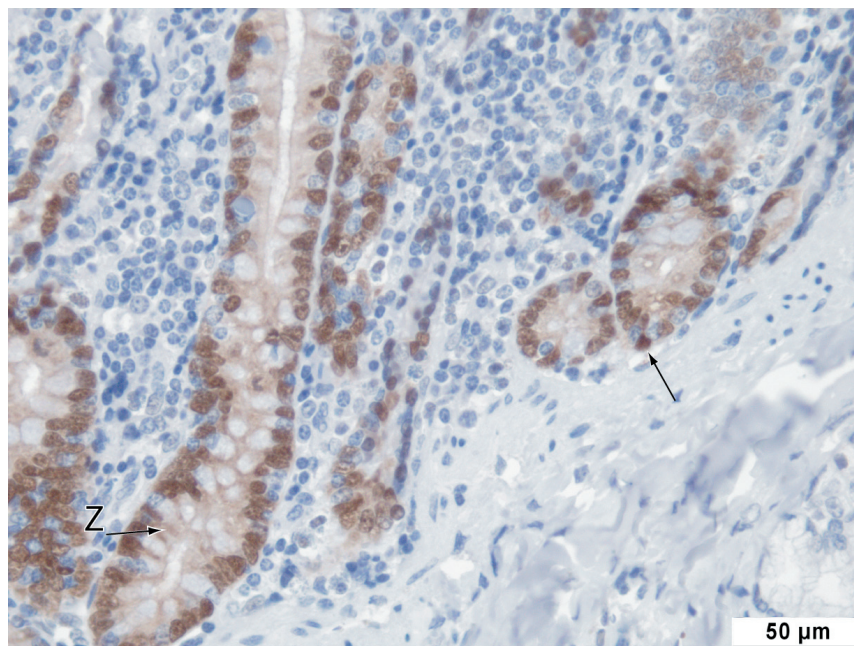


Abbildung 17: Immunhistochemischer Nachweis von Vitamin D-Rezeptoren im Duodenum descendens einer Ziege: Basale Drüsenabschnitte weisen stark positiv reagierende Enterozytenzellkerne (→) neben mittelgradig- und schwach angefärbten Exemplaren auf. Das Zytosol (Z) der Enterozyten ist meist mittelgradig stark angefärbt.

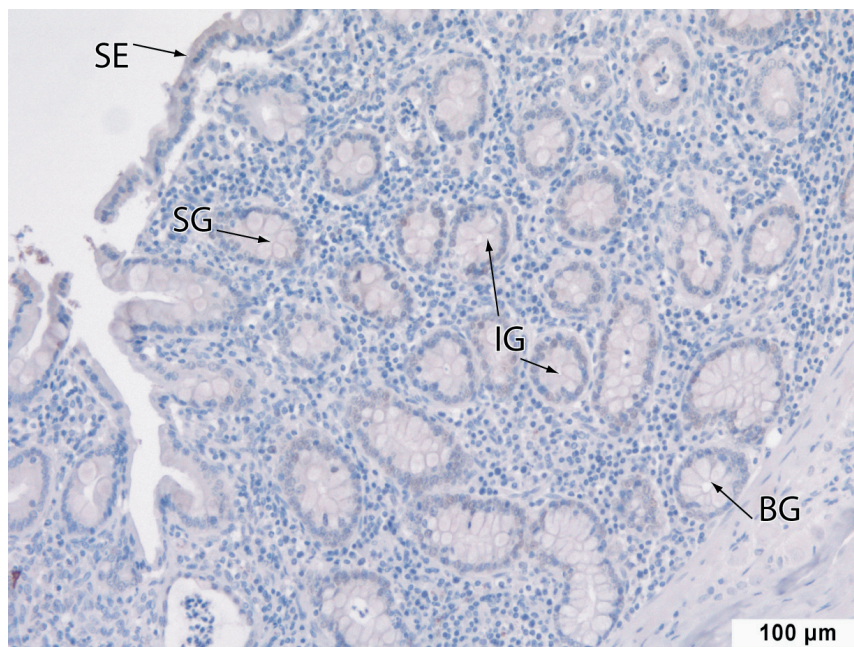


Abbildung 18: Immunhistochemischer Nachweis von Vitamin D-Rezeptoren im Cäkum einer Ziege: Generell schwach bis sehr schwach reagierende Enterozytenzellkerne werden in allen Drüsenabschnitten vorgefunden. BG = basale, IG = intermediäre und SG = oberflächliche Drüsenabschnitte, SE = Oberflächenepithel.

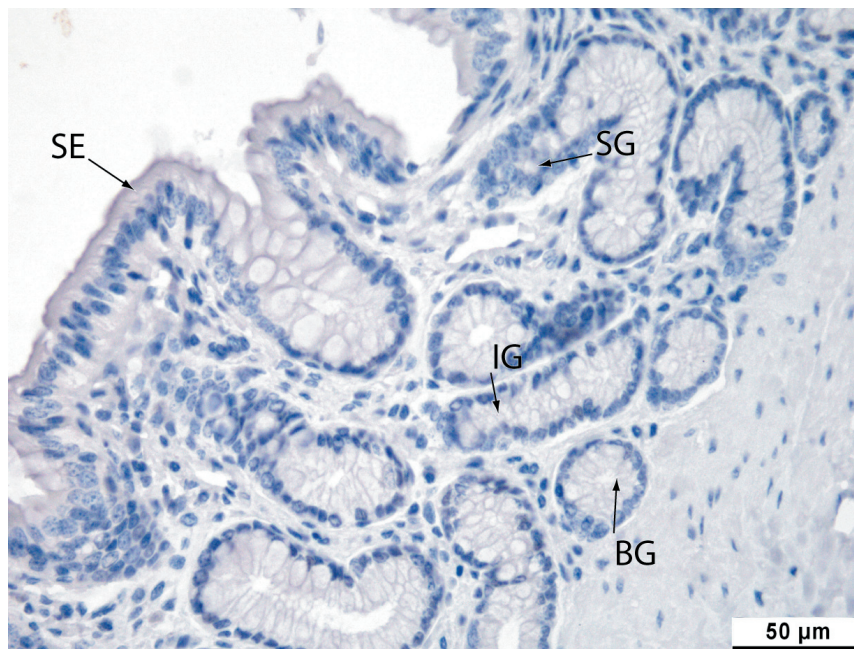


Abbildung 19: Immunhistochemischer Nachweis von Vitamin D-Rezeptoren im Colon descendens einer Ziege: Das Zytoplasma der Enterozyten des Oberflächenepithels (SE) ist nur wenig immunopositiv. BG = basale, IG = intermediäre und SG = oberflächliche Drüsenabschnitte, SE = Oberflächenepithel.

6.1.2.3 Die einzelnen Darmabschnitte im Vergleich

Wie Abbildung 20 zeigt, war in allen 6 Darmabschnitten eine immunhistochemische Farbreaktion nachweisbar. Dabei war die Farbreaktion im DD am stärksten (MW= 592; SF= 72). Es bestand kein signifikanter Unterschied zum DA ($p= 0,198$), welches eine ähnliche Farbintensität aufwies (MW= 509; SF= 66). Mit einem Mittelwert von 327 im JE und 123 im IL nahm die Farbreaktion in aboraler Richtung ab. Im IL wurde bei den Schlachtziegen der tiefste Wert gemessen.

Im DD waren signifikant mehr Rezeptoren vorhanden als im JE, IL, CC und CD ($p< 0,0001$).

Zwischen DA und JE bestand kein signifikanter Unterschied. Hingegen war im DA eine signifikant stärkere Farbreaktion messbar als im IL, CC und CD ($p< 0,0001$).

Einzig zum IL wies JE einen signifikanten Unterschied auf. Im JE waren signifikant mehr Rezeptoren nachweisbar als im IL ($p=0,0016$).

Sowohl CC als auch CD unterschieden sich nicht signifikant von IL. Zwischen den beiden Dickdarmabschnitten CC und CD bestand ebenfalls kein signifikanter Unterschied in der VDR-Reaktion.

Im Dünndarm (v.a. DD und DA) war die stärkste Farbreaktion vorhanden. Diese schwächte sich im JE und noch stärker im IL ab. Die Mittelwerte im Dickdarm waren geringgradig höher als im IL, es bestand aber kein signifikanter Unterschied.

Die Mittelwerte des DD und DA lagen mit einer Differenz von 82 nahe zusammen. Das Gleiche traf für den Dickdarm zu. Hier wiesen die Mittelwerte eine Differenz von 20 auf. Die Mittelwerte von DD (592; SF= 72) und IL (123; SF= 5) lagen um den Faktor 4,81 auseinander.

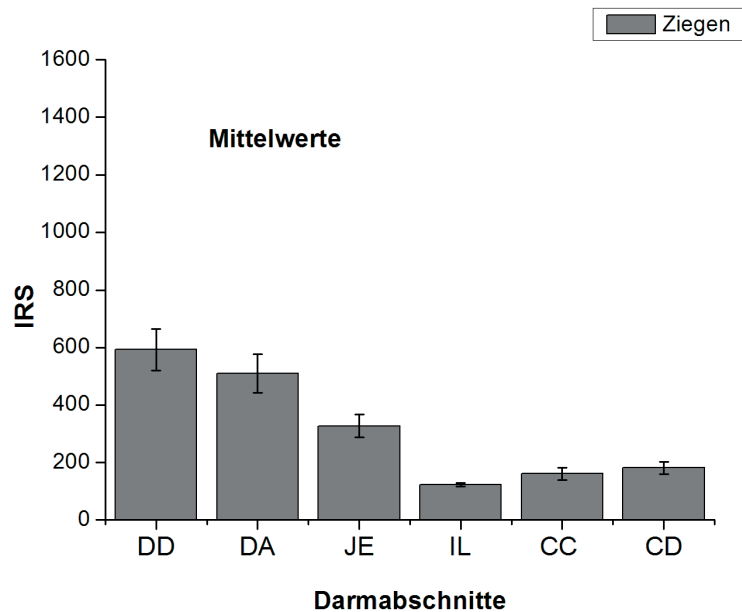


Abbildung 20: Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte des in verschiedenen Darmabschnitten bestimmten immunreaktiven Scores (IRS) bei Schlachtziegen. DD = Duodenum descendens, DA = Duodenum ascendens, JE = Jejunum, IL = Ileum, CC = Cäkum, CD = Colon descendens.

6.1.2.4 Die einzelnen Darmabschnitte im Vergleich unter Einbindung der unterschiedlichen Schleimhautstellen

Wie in Abbildung 21 dargestellt, war in allen Schleimhautstellen der einzelnen Darmabschnitte eine immunhistochemische Reaktion nachweisbar. In den basalen Drüsenabschnitten des DD war eine signifikant stärkere Farbreaktion nachweisbar als in den entsprechenden Drüsenabschnitten von JE, IL, CC und CD (Tabelle 7). Für DA wurde dasselbe Resultat erhalten. Zwischen den basalen Drüsenabschnitten des DD und DA bestand kein signifikanter Unterschied ($p=0,1212$). Die basalen Drüsenabschnitte des JE wiesen signifikant mehr Rezeptoren auf als in den entsprechenden Schichten im IL, CC und CD.

Sowohl im DD als auch im DA war in den intermediären Drüsenabschnitten eine signifikant stärkere Farbreaktion nachzuweisen als in denen von JE, IL, CC und CD ($p < 0,0001$).

In den oberflächlichen Drüsenabschnitten bestand nur zwischen DD und IL ein signifikanter Unterschied ($DD > IL$, $p=0,0017$).

Wie Tabelle 8 zeigt, waren im DD sowohl die Werte der basalen als auch die Werte der intermediären Drüsenabschnitte signifikant grösser als diejenigen der oberflächlichen Drüsenabschnitte und des Oberflächenepithels. Im DA und JE gelangte man zum selben Ergebnis (BG und IG > SG, SE).

Die Werte der basalen und intermediären Drüsenabschnitte im IL waren signifikant grösser als diejenigen des Oberflächenepithels.

Zwischen den einzelnen Drüsenabschnitten war im CC kein signifikanter Unterschied vorhanden.

Im CD waren die Messwerte der intermediären Drüsenabschnitte signifikant grösser als die des Oberflächenepithels.

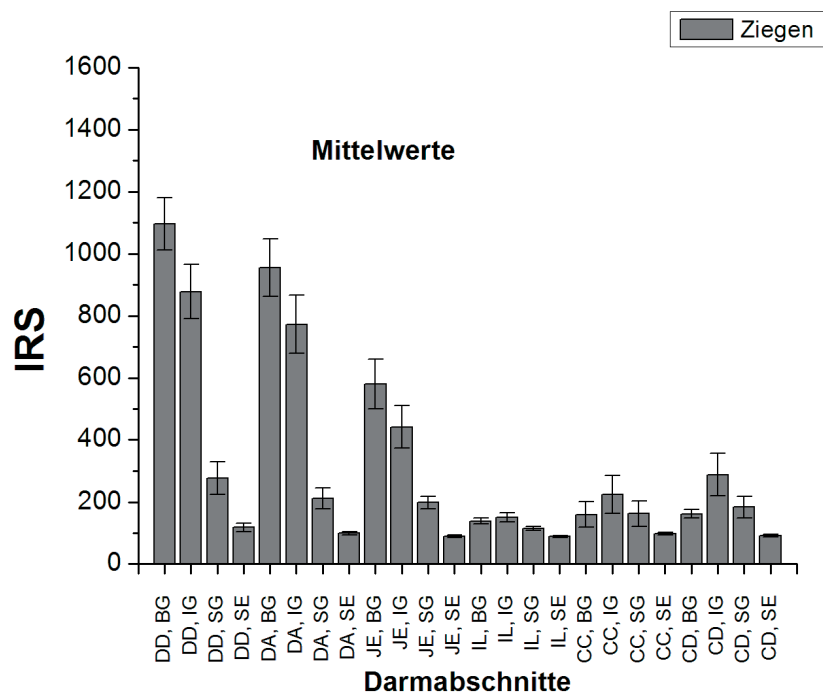


Abbildung 21: Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte des in verschiedenen Darmabschnitten bestimmten immunreaktiven Scores (IRS) bei Schlachtziegen in Bezug auf die Lokalisation in den Drüsen und im Oberflächenepithel. DD = Duodenum descendens, DA = Duodenum ascendens, JE = Jejunum, IL = Ileum, CC = Cäkum, CD = Colon descendens, BG = basale Drüsenabschnitte, IG = intermediäre Drüsenabschnitte, SG = oberflächliche Drüsenabschnitte, SE = Oberflächenepithel.

Tabelle 7: Signifikante Differenzen zwischen den einzelnen Darmabschnitten in Bezug auf die Drüsenabschnitte und das Oberflächenepithel bei Schlachtziegen.
 * Unterschied zwischen Schaf und Ziege.
 BG = basale Drüsenabschnitte, IG = intermediäre Drüsenabschnitte, SG = oberflächliche Drüsenabschnitte, SE = Oberflächenepithel.

BG:	DD > JE, IL, CC, CD
BG:	DA > JE, IL, CC, CD
BG:	JE > IL*, CC, CD*
IG:	DD > JE, IL, CC, CD
IG:	DA > JE*, IL, CC, CD*
SG:	DD > IL*
SE:	keine Sign.

Tabelle 8: Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Drüsenabschnitten und dem Oberflächenepithel in Abhängigkeit vom Darmabschnitt bei Schlachtziegen.
 DD = Duodenum descendens, DA = Duodenum ascendens, JE = Jejunum, IL = Ileum, CC = Cäkum, CD = Colon descendens.

DD:	BG > SG, SE
DD:	IG > SG, SE
DA:	BG > SG, SE
DA:	IG > SG, SE
JE:	BG > SG, SE
JE:	IG > SG, SE
IL:	BG > SE
IL:	IG > SE
CC:	keine Sign.
CD:	IG > SE

6.1.2.5 Unterschiede zwischen Schlachtschafen und Schlachtziegen

Wie in Tabelle 9 dargestellt, waren die Summen der Mittelwerte der Schafe in sämtlichen Darmabschnitten grösser als die der Ziegen. Genauer betrachtet lagen die Summen der Mittelwerte des DD bei der Ziege um den Faktor 3,2 und beim Schaf um den Faktor 2,5 höher als die des CD (Tabelle 9). Der im Hinblick auf die Aussagekraft und Repräsentativität der Kolonbiopsien ermittelte Korrelationskoeffizient zwischen dem IRS des DD und dem des CD bei den Ziegen war signifikant positiv (r-Wert= 0,95; p-Wert= 0,002). Ein ähnliches Resultat wurde bei den Schafen ermittelt (r-Wert= 0,94; p-Wert= 0,012).

Tabelle 9: Vergleichende Darstellung der Summen des Mittelwerte des IRS von Schlachtschafen und Schlachtziegen.
DD = Duodenum descendens, DA = Duodenum ascendens, JE = Jejunum, IL = Ileum, CC = Cäkum, CD = Colon descendens.

Darmabschnitt	Schafe	Ziegen
DD	3054,33	2370,00
DA	2701,53	2039,63
JE	1657,73	1310,50
IL	1120,48	494,00
CC	1082,08	644,75
CD	1195,70	724,73
Faktor DD/CD	2,55	3,20

6.1.3 Nachweis von Vitamin D-Rezeptoren in Colonbiopsien bei ostfriesischen Milchschaafen und Saanenziegen

In sämtlichen Colonbiopsien war der VDR immunhistochemisch nachweisbar (Abbildung 22). Die statistische Auswertung des immunreaktiven Scores der Schaf- und Ziegenbiopsien mittels 3-faktorieller Varianzanalyse ergab, dass der Faktor Tierart einen signifikanten Einfluss (F-Wert= 56,6; p-Wert < 0,001) hatte. Somit unterschieden sich die Resultate der Schaf- und Ziegenbiopsien signifikant voneinander.

Aus diesem Grund wurden die statistischen Berechnungen getrennt nach Tierart und die anschliessende Beschreibung der erhaltenen Resultate vergleichend durchgeführt.

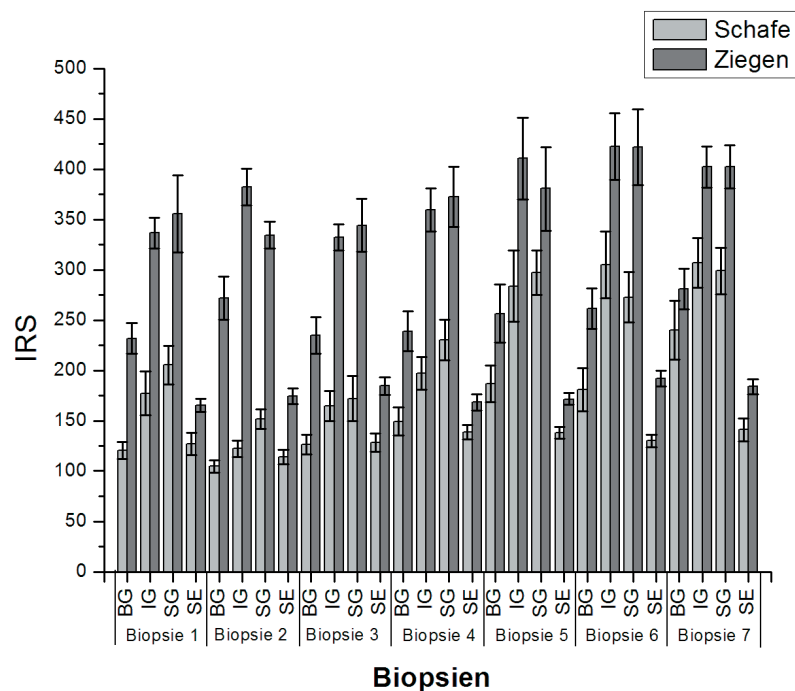


Abbildung 22: Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte des in Kolonbiopsien bestimmten immunreaktiven Scores (IRS) im Vergleich zwischen Schafen und Ziegen. BG = basale Drüsenabschnitte, IG = intermediäre Drüsenabschnitte, SG = oberflächliche Drüsenabschnitte, SE = Oberflächenepithel.

6.1.3.1 Histomorphologische Beschreibung

In den Biopsien waren morphologisch folgende Strukturen voneinander abgrenzbar: Als unterste Schicht und nicht in allen Schnitten vorhanden, die longitudinal und quer angeordneten Muskelschichten. Darauf folgte die Tunica mucosa mit ihren in Bindegewebe eingebetteten Drüsenabschnitten. Da es sich bei den Biopsien um Colonproben handelte, wiesen diese in den Drüsen viele Becherzellen auf, welche sich negativ darstellten. Dadurch entstand ein deutlicher Kontrast zwischen positiv und negativ angefärbten Zellen. Als letzte Schicht folgte schliesslich das Oberflächenepithel.

Spezifisch angefärbt wurden die Kerne der Enterozyten. Im Zytoplasma dieser Zellen liess sich ebenfalls, wenn auch eine deutlich schwächere, immunhistochemische Reaktion nachweisen.

Die BG zeigten, wie die Colonproben bei den Schlachttieren, eine geringe Anfärbung der Zellkerne. Es waren hauptsächlich sehr schwach bis schwach angefärbte Zellkerne vorhanden. Kerne mit mittlerer Färbung waren in der Unterzahl. Eine viel grössere Zahl an stark positiven Zellen befanden sich in den IG und vor allem in den SG. Im Unterschied zu den Schlachttierproben wies das Oberflächenepithel weniger positive Enterozyten auf, dafür reagierten diese mit einer starken Farbreaktion und stachen dadurch sehr deutlich aus dieser Schicht hervor, vor allem weil hier deutlich weniger schwach und sehr schwach positive

Zellkerne im Vergleich zu den Schlachttieren vorhanden waren. Siehe dazu Abbildungen 23 bis 28.

6.1.3.2 Signifikante Unterschiede im Verlaufe der Laktation

Während bei den Schafen der Faktor Zeit in der 3-faktoriellen Varianzanalyse einen signifikanten Unterschied aufwies ($p < 0,0001$), war dies bei den Ziegen nicht der Fall. Siehe dazu Tabelle 10.

In den Biopsien t1, t2, t3 und t4 der Schafe war in den basalen Drüsenabschnitten eine signifikant schwächere Farbreaktion gegenüber denselben Stellen in der Biopsie zum Zeitpunkt t7 vorhanden. In den BG der Biopsie t2 trat dieselbe Signifikanz bei den Schafen gegenüber der Biopsie t5 auf.

Die intermediären Drüsenabschnitte der Schafbiopsien t1, t2, t3 und t4 wiesen signifikant tiefere Werte auf als die entsprechend intermediären Drüsenabschnitte der Biopsien t5, t6 und t7.

In den oberflächlichen Drüsenabschnitten wiesen die Biopsien t1, t2 und t3 bei den Schafen signifikant tiefere Werte gegenüber denen von t5 und t7 an derselben Stelle auf. Schafbiopsien t2 und t3 zeigten an derselben Stelle signifikant tiefere Werte gegenüber der Schafbiopsie t6.

Bei den Ziegen waren in den Drüsen im Verlauf der Laktation keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Zeitpunkten feststellbar.

Sowohl bei den Schaf- als auch bei den Ziegenbiopsien waren im Oberflächenepithel im Verlaufe der Laktation keine signifikanten Unterschiede vorhanden.

Tabelle 10: Vergleichende tabellarische Darstellung der signifikanten Differenzen zwischen den einzelnen Entnahmezeitpunkten in Abhängigkeit von den Drüsenabschnitten bzw dem Oberflächenepithel.
BG = basale Drüsenabschnitte, IG = intermediäre Drüsenabschnitte, SG = oberflächliche Drüsenabschnitte, SE = Oberflächenepithel.

Abschnitt	Schafe	Ziegen
BG:	t5 > t2	keine Sign.
BG:	t7 > t1, t2, t3, t4	keine Sign.
IG:	t7 > t1, t2, t3, t4	keine Sign.
IG:	t6 > t1, t2, t3, t4	keine Sign.
IG:	t5 > t1, t2, t3, t4	keine Sign.
SG:	t7 > t1, t2, t3	keine Sign.
SG:	t6 > t2, t3	keine Sign.
SG:	t5 > t1, t2, t3	keine Sign.
SE:	keine Sign.	keine Sign.

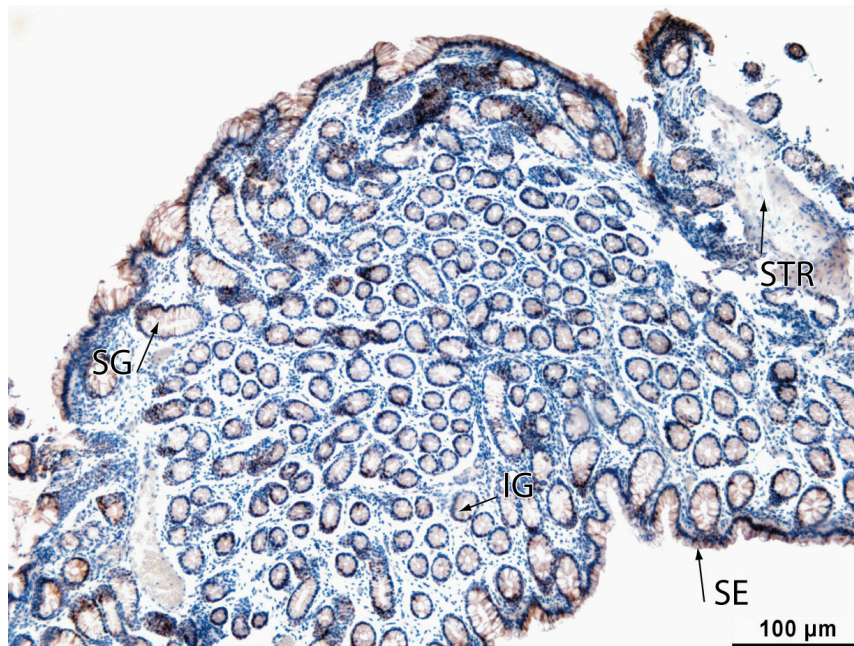


Abbildung 23: Immunhistochemischer Nachweis von Vitamin D-Rezeptoren in einer Biopsie aus dem Colon descendens eines Milchschafoes: Die Biopsie t1, während der Trächtigkeit entnommen, zeigt eine homogene Verteilung der Immunreaktion. Die Drüsen umgebendes Stroma (STR) ist infolge der Mikrowellenbehandlung zur Antigendemaskierung teilweise aufgelöst. IG = intermediäre und SG = oberflächliche Drüsenabschnitte, SE = Oberflächenepithel; STR = Stroma.

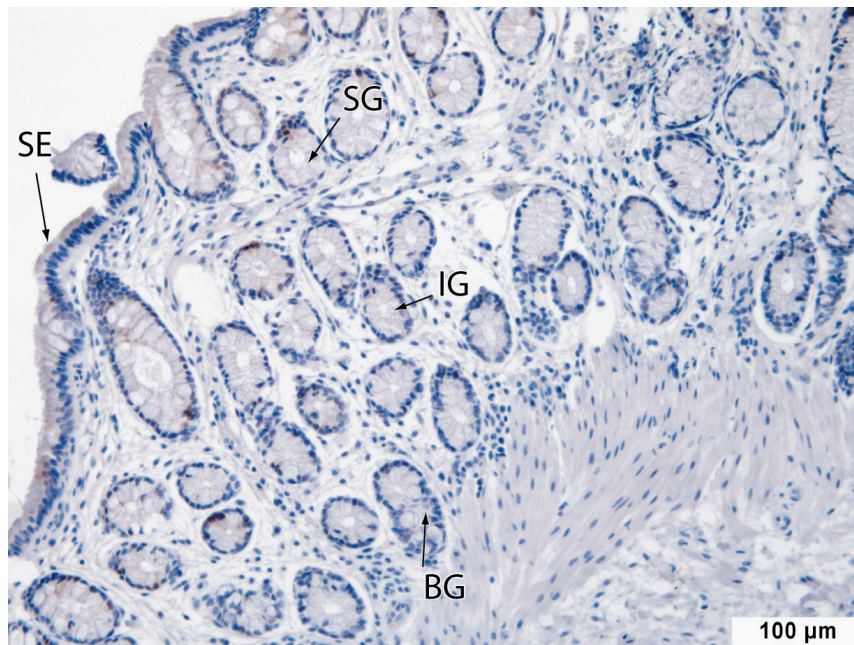


Abbildung 24: Immunhistochemischer Nachweis von Vitamin D-Rezeptoren in einer Biopsie aus dem Colon descendens eines Milchschafoes: Die Biopsie t2, 1 Woche post partum entnommen, zeigt im Vergleich zu der in Abb. 23 gezeigten weniger VDR-positive Kerne. Die stärkste Immunreaktion war in den oberflächlichen Drüsenabschnitten (SG) zu verzeichnen. BG = basale und IG = intermediäre Drüsenabschnitte, SE = Oberflächenepithel.

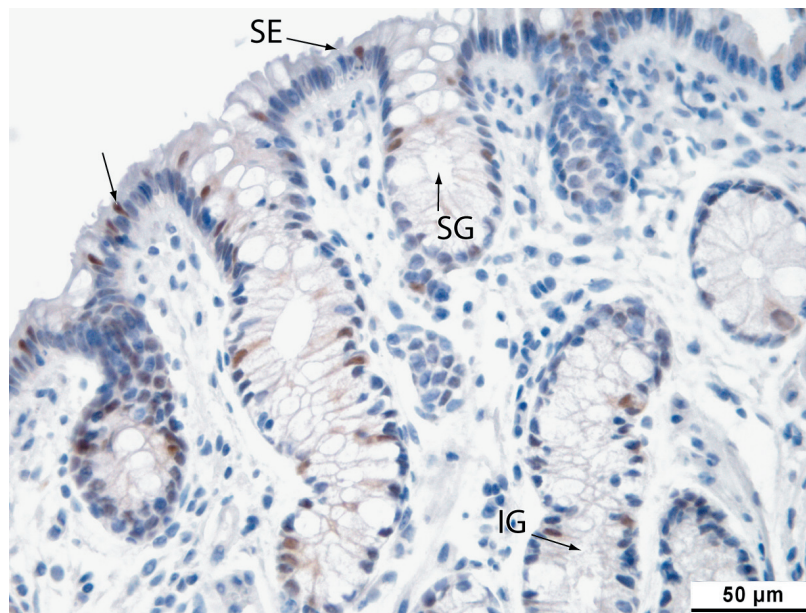


Abbildung 25: Immunhistochemischer Nachweis von Vitamin D-Rezeptoren in einer Biopsie aus dem Colon descendens eines Milchschaafes: Die Biopsie t7, 20 Wochen post partum entnommen, weist vereinzelt stark positive Enterozytenzellkerne im Oberflächenepithel (SE) auf. Daneben kommen auch negative und schwach sowie mittelgradig immunopositive Zellkerne, sowohl im Oberflächen- als auch im Drüsenepithel vor. (→) = stark angefärbte Zellkerne, IG = mittlere und SG = oberflächliche Drüsenabschnitte, SE = Oberflächenepithel.

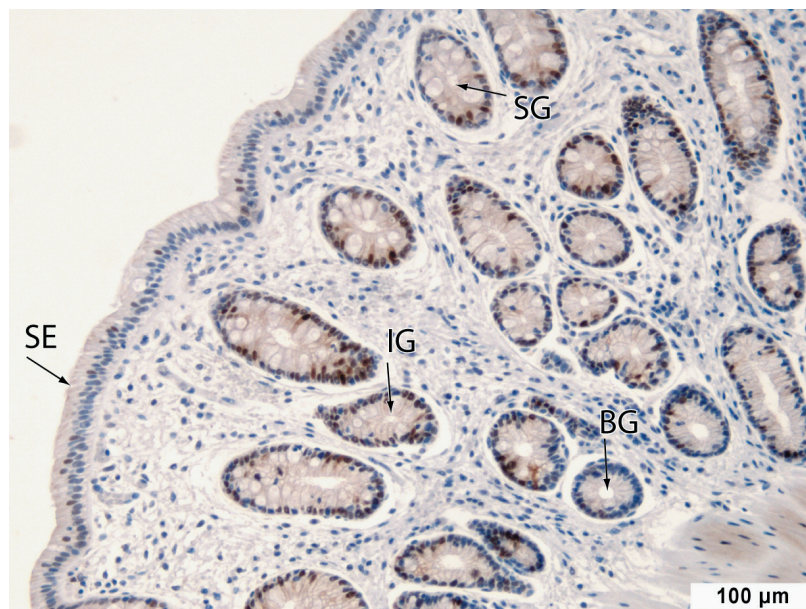


Abbildung 26: Immunhistochemischer Nachweis von Vitamin D-Rezeptoren in einer Biopsie aus dem Colon descendens einer Saanenziege: Die Biopsie t1, während der Trächtigkeit entnommen, zeigt im Vergleich zu der entsprechenden vom Schaf (Abb. 23) eine stärkere Reaktion in allen Drüsen- und Oberflächenepithelien. Stark positive Kerne treten im Oberflächenepithel (SE) bereits in diesem Stadium deutlich hervor. BG = basale, IG = intermediäre und SG = oberflächliche Drüsenabschnitte.

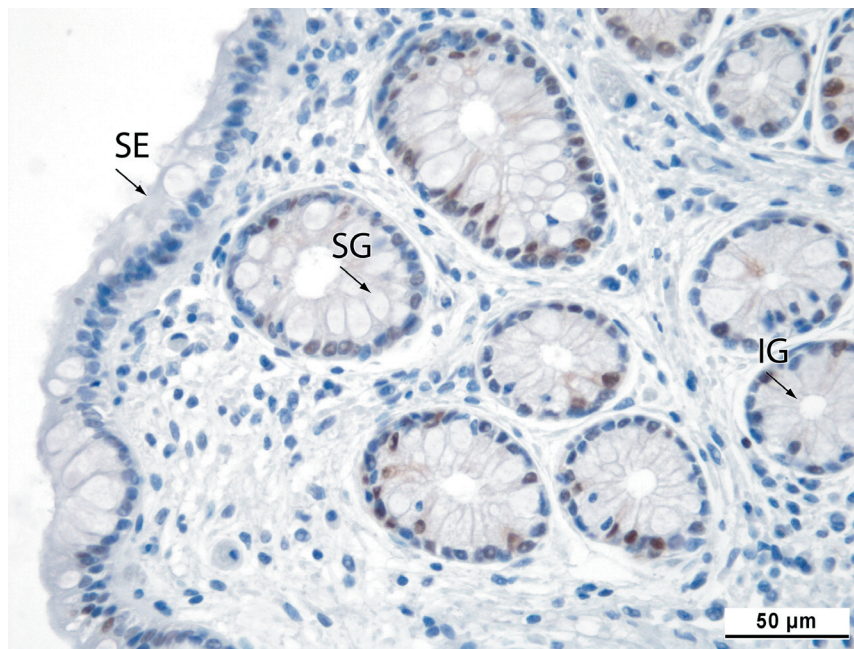


Abbildung 27: Immunhistochemischer Nachweis von Vitamin D-Rezeptoren in einer Biopsie aus dem Colon descendens einer Saanenziege: Die Biopsie t2, 1 Woche post partum entnommen, weist stark positive Zellkerne neben solchen mit negativer, schwacher und mittelgradiger Immunreaktion auf. IG = intermediäre und SG = oberflächliche Drüsenabschnitte, SE = Oberflächenepithel.

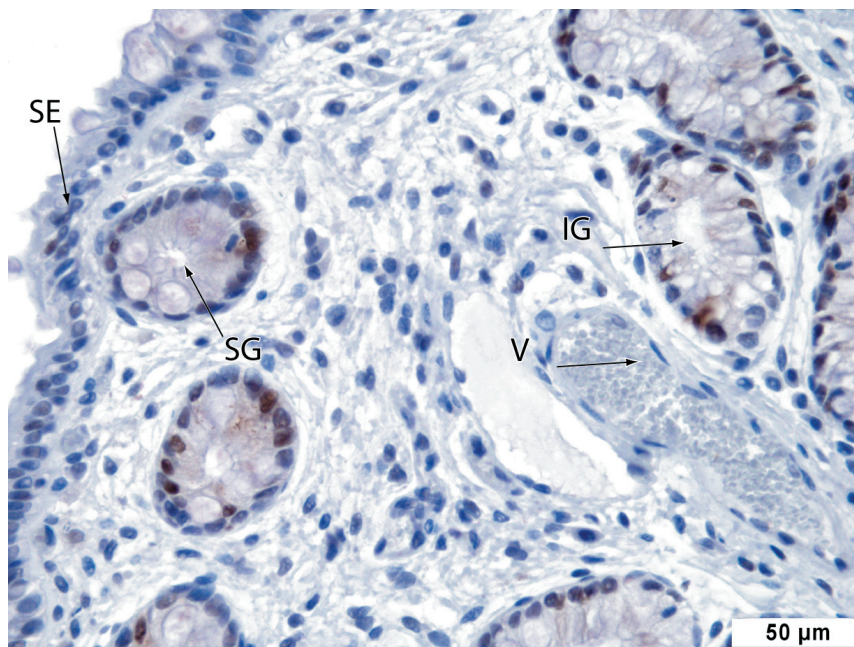


Abbildung 28: Immunhistochemischer Nachweis von Vitamin D-Rezeptoren in einer Biopsie aus dem Colon descendens einer Saanenziege: Die Biopsie t7, 20 Wochen post partum entnommen, weist keine nennenswerten Unterschiede zu Biopsie 2 auf. IG = intermediäre und SG = oberflächliche Drüsenabschnitte, SE = Oberflächenepithel, V = kleine Vene mit Erythrozyten.

6.1.3.3 Signifikante Unterschiede in den einzelnen Drüsenabschnitten

Sowohl bei den Schaf- als auch bei den Ziegenbiopsien ergab die 3-faktorielle Varianzanalyse einen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Drüsenabschnitten ($p < 0,0001$).

Wie in Tabelle 11 gezeigt wiesen die ersten 4 Biopsien der Schafe (t1 bis t4) in den einzelnen Drüsenabschnitten wenige Signifikanzen auf. Ab Biopsie t5 bestanden mehr signifikante Unterschiede, wobei sich diese meistens gegenüber dem Oberflächenepithel zeigten.

Ein anderes Bild zeigte sich bei den Ziegen (Tabelle 11). Hier fielen schon in den ersten vier Biopsien (t1 bis t4) Signifikanzen auf, ebenfalls vorwiegend bezüglich des Oberflächenepithels.

In Schafbiopsie t1 war einzig die Farbintensität der BG signifikant geringer als in den oberflächlichen Drüsenabschnitten (Tabelle 11). Dieselbe Signifikanz war bei der Ziege vorhanden (t1: BG < SG). Zusätzlich waren in den Ziegenbiopsien t1 die IG und SG signifikant stärker angefärbt als das zugehörige Oberflächenepithel (t1: SE < IG, SG).

Bei Schafbiopsie t2 waren innerhalb der verschiedenen Stellen keine signifikanten Differenzen vorhanden. Dieselbe Biopsie bei den Ziegen wies in IG und SG signifikant höhere Werte auf als im Oberflächenepithel (t2: SE < IG, SG).

Schafbiopsie t3 wies innerhalb der verschiedenen Stellen keine Signifikanzen auf. Bei der Ziegenbiopsie zu Zeitpunkt t3 zeigte sich dasselbe Bild wie zu Zeitpunkt t2 (t3: SE < IG und SG).

Einzig SG der Schafbiopsie t4 hatte signifikant mehr Rezeptoren als SE t4 (t4: SG > SE). Ziegenbiopsie t4 enthielt signifikant weniger an Rezeptoren in BG als in IG und SG. Zusätzlich wurde in IG und SG der Ziegen eine signifikant stärkere Farbreaktion gemessen als in SE derselben Tierart (t4: BG < IG, SG > SE).

Die Schafbiopsien t5 wiesen in den BG signifikant weniger Rezeptoren auf als in IG und SG. IG und SG zeigten eine signifikant stärkere Reaktion gegenüber SE (t5: BG < IG, SG > SE). Bei den Ziegenbiopsien ergab sich dasselbe Ergebnis (t5: BG < IG, SG > SE).

Zum Zeitpunkt t6 waren in den BG der Schafe signifikant weniger Rezeptoren angefärbt als in den IG und SG. IG und SG der Schafe zeigten signifikant grössere Werte als SE (t6: BG < IG, SG > SE). Dasselbe traf für die Ziegen zu (t6: BG < IG, SG > SE).

Die Schafbiopsie zum Zeitpunkt t7 zeigte in allen 3 Drüsenabschnitteschichten signifikant grössere Werte als im Oberflächenepithel (t7: BG, IG, SG > SE). Bei den Ziegen sind zu diesem Zeitpunkt die Werte der IG und SG signifikant grösser als die von SE, zusätzlich wiesen BG signifikant weniger Rezeptoren auf als IG und SG (t7: BG < IG, SG > SE).

Tabelle 11: Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Drüsenabschnitten im Verlaufe der Zeit.
 BG = basale Drüsenabschnitte, IG = intermediäre Drüsenabschnitte, SG = oberflächliche Drüsenabschnitte, SE = Oberflächenepithel.

Schafe

Biospie	Drüsenabschnitt	Signifikante Unterschiede innerhalb der einzelnen Drüsenabschnitte
t1	BG	< SG
	IG	keine Sign.
	SG	keine Sign.
	SE	keine Sign.
t2	BG	keine Sign.
	IG	keine Sign.
	SG	keine Sign.
	SE	keine Sign.
t3	BG	keine Sign.
	IG	keine Sign.
	SG	keine Sign.
	SE	keine Sign.
t4	BG	keine Sign.
	IG	keine Sign.
	SG	> SE
	SE	keine Sign.
t5	BG	< IGt5, SGt5
	IG	> SE
	SG	> SE
	SE	keine Sign.
t6	BG	< IG, SG
	IG	> SE
	SG	> SE
	SE	keine Sign.
t7	BG	> SE
	IG	> SE
	SG	> SE
	SE	keine Sign.

Tabelle 11: Fortsetzung.

Ziegen

Biospie	Drüsenabschnitt	Signifikante Unterschiede innerhalb der einzelnen Drüsenabschnitte
t1	BG	< SG
	IG	> SE
	SG	> SE
	SE	
t2	BG	
	IG	> SE
	SG	> SE
	SE	
t3	BG	
	IG	> SE
	SG	> SE
	SE	
t4	BG	< IG, SG
	IG	> SE
	SG	> SE
	SE	
t5	BG	< IG, SG
	IG	> SE
	SG	> SE
	SE	
t6	BG	< IG, SG
	IG	> SE
	SG	> SE
	SE	
t7	BG	< IG, SG
	IG	> SE
	SG	> SE
	SE	

7 Diskussion

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, durch immunhistochemischen Nachweis das Vorkommen und die Verteilung der Vit D-Rezeptoren im Darm beim kleinen Wiederkäuer zu untersuchen. Durch die immunhistochemische Darstellung dieses Rezeptors an Proben aus 6 verschiedenen Darmabschnitten von Schlachtschafen und -ziegen soll eine Basis für weitere Untersuchungen gelegt werden, um die Rolle dieses Steroidhormones bei der Kalziumresorption und bei der Entstehung der Hypokalzämie weitergehend zu erforschen. Zusätzlich wurde in Colonbiopsien bei trächtigen und laktierenden Schafen und Ziegen vergleichend die Menge der Vit D-Rezeptoren semiquantitativ bestimmt, um deren Änderungen unter den speziellen Anforderungen durch die Laktation und Gravidität zu verfolgen und einen tieferen Einblick in mögliche Regulationsmechanismen zu erhalten. Ein weiteres Ziel war es, eine mögliche Korrelation zwischen den unterschiedlichen Symptomen und Auftretenszeiträumen der Hypokalzämie bei den beiden Wiederkäuerspezies und der Verteilungscharakteristik der Vit D-Rezeptoren zu erhalten. Studien am Rind (Horst et al., 1989) und an der Ratte (Goff et al. 1988) sollen zu Vergleichszwecken herangezogen werden. Ziele dieser vorangegangenen Pilotstudien waren einerseits Effekte von Trächtigkeit und Laktation auf den Vit D-Rezeptorgehalt nachzuweisen und andererseits die mögliche Rolle der Vit D-Rezeptoren bei der Entstehung der Hypokalzämie aufzuzeigen.

Bei der Probengewinnung wurde insbesondere darauf geachtet, dass die Entnahme aus DD und DA bei den Schlachttieren schnellstmöglichst durchgeführt wurde, weil in diesen Darmabschnitten vermehrt Verdauungsenzyme, vorwiegend das den Rezeptor schädigende Trypsin vorhanden sind. Allegretto et al. (1987) konnten zeigen, dass der Vit D-Rezeptor des Huhnes durch endogene und exogene Proteasen abgebaut wird, was zu fehlerhaft erniedrigten Messresultaten führen könnte. Eine Möglichkeit, die Aktivität dieser Proteasen zu hemmen, hätte in der Zugabe eines Trypsininhibitors bei der Probeentnahme oder beim anschliessenden Auftauen nach Aufbewahrung bei -80°C bestanden. Dies wurde jedoch erst im Rahmen eines Folgeprojektes und nicht in der vorliegenden Studie durchgeführt. In dem besagten Folgeprojekt wurde der Darm von Schlachtschafen und -ziegen sofort in einen Puffer gegeben, welchem zuvor ein Sojabohnentrypsininhibitor (Trasylol®, Bayer) zugesetzt wurde.

Um eine möglichst einheitliche Qualität der Gewebe in den Paraplastschnitten für den immunhistochemischen Nachweis zu gewährleisten, wurde mit Hilfe der Hämalaun-Eosin-Färbung zunächst eine histomorphologische Untersuchung der Schnitte vorgenommen. Bei den Schlachttieren wurden die besten und vollständigsten Schnitte der jeweiligen Darmabschnitte für den immunhistochemischen Nachweis aus dem weit grösseren Probenmaterial ausgesucht. Die Biopsien unterschieden sich in ihrer Morphologie insofern, als dass von einzelnen Biopsien, infolge unterschiedlich weit oberflächlicher Entnahme,

nicht alle Gewebeteile der Schleimhaut vollständig vorhanden waren. Somit konnte die unter der Mucosa gelegene Muskelschicht zur besseren Orientierung nicht immer erfasst werden, wodurch sich die Auswertung der Lokalisationen (BG, IG, SG, SE) schwieriger gestaltete. Aufgrund der charakteristischen Morphologie konnten jedoch die verschiedenen Drüsenabschnitte mit grosser Sicherheit zutreffend angesprochen und zugeteilt werden. Die Resultate könnten daher durch die unterschiedlichen Entnahmetiefen in geringem Umfang beeinflusst worden sein.

Gegenüber dem biochemischen Nachweis von Hormonrezeptoren hat die immunhistochemische Technik den Vorteil der eindeutigen topografischen Ansprache rezeptortragender Zellen im Gewebeverband (Krüdewagen 1996). Die Auswertung des immunhistochemischen Nachweises ist jedoch bei visueller Bestimmung der Farbintensität und des Prozentsatzes der positiv angefärbten Zellen in einem gewissen Mass sowohl vom Untersucher als auch von Interassay-Varianzen beim immunhistochemischen Nachweis selbst abhängig (Kohtes 1998).

Im Rahmen dieser Untersuchung konnten im Darm von Schaf und Ziege Vit D-Rezeptoren in den Zellkernen der Enterozyten nachgewiesen werden. Die stärkere Intensität der immunhistochemischen Reaktion in den basalen Drüsenabschnitten im Vergleich zu den oberflächlichen Drüsenabschnitten ist in Übereinstimmung mit Ergebnissen von Clemens et al. (1988) an Hühnerenterozyten, an denen mittels Immunhistochemie gezeigt werden konnte, dass die Kerne verstärkt in den Krypten und weniger deutlich an den Zotten reagierten. Daraus wurde geschlossen, dass die Expression des Vit D-Rezeptors mit der zellulären Differenzierung der Enterozyten korreliert sein könnte (Clemens et al. 1988). Diese Annahme konnten Pillai et al. (1988) durch den Nachweis einer unterschiedlichen Menge an Vit D-Rezeptoren in ungleich weit differenzierten Keratinozyten der Epidermis des Menschen in vitro bestätigen. Zellen in einem frühen Wachstumsstadium (präkonfluierende und konfluierende Zellen) wiesen hier eine grössere Anzahl Vit D-Rezeptoren auf, als Zellen (postkonfluierende Zellen) welche bereits fortgeschritten differenziert waren. Eine mögliche Ursache dafür könnte darin liegen, dass bereits weiter differenzierte Zellen andere Stoffwechselaufgaben übernehmen und somit andere Proteine verstärkt exprimiert werden. Eine zusätzliche Möglichkeit wäre, dass der Rezeptor in weniger differenzierten Zellen langsamer abgebaut wird als in Zellen mit fortgeschrittener Differenzierung.

An eine Veränderung des Vit D-Rezeptorgehaltes nach erfolgter Hormonbindung muss ebenfalls gedacht werden. Diese Vermutung erfolgt aufgrund von Untersuchungen an kultivierten Mausfibroblasten von Haussler (1986). Es konnte eine Hormon-abhängige Veränderung des Rezeptors in Form einer kovalenten Modifikation nachgewiesen werden. Diese Modifikation führte einerseits zu einer verlangsamten Laufgeschwindigkeit des Rezeptors in der Gelelektrophorese, andererseits nahm das Molekulargewicht von 54kDa auf 55 kDa zu. Zudem wird vermutet, dass das Hormon befähigt ist, die Turnoverrate seines Rezeptors entweder durch verstärkte Biosynthese oder durch reduzierte Degradation, zu

verändern (Haussler 1986).

Das Ergebnis, dass die Vit D-Rezeptoren nur tief in den Krypten und in sehr geringem Umfang im Oberflächenepithel sowohl der Zotten des Dünndarms als auch der zottenfreien Schleimhaut des Dickdarmes vorkommen, erscheint aufgrund der recht kurzen Lebensdauer der Enterozyten in Verbindung mit der Zeitspanne zwischen dem Einwirken von Vitamin D und der nachfolgenden Synthese von entsprechend regulierten Proteinen - z. B. dem CBP₉, dem CBP₂₈ oder dem Vit D-Rezeptor selbst - Sinn zu machen. Erstere beträgt ca. 70 h (Ferraris et al. 1992) und letztere ist zwischen 8 und 24 bis 48 h anzusetzen (Belkacemi et al. 2005). Für die Wirkung des neu synthetisierten Proteins verbleibt damit eine Periode zwischen ungefähr 20 bis 60 h (Ferraris et al. 1992, Belkacemi et al. 2005).

Dass der Rezeptor nicht nur im Kern, sondern auch im Zytoplasma lokalisiert sein könnte, bestätigten Untersuchungen von Pike und Haussler (1979) am Hühnerdarm. Die Autoren gingen davon aus, dass nur 0,001 % der gesamten Zytosolproteinmenge aus Vit D-Rezeptoren bestehen. Bei dieser als sehr gering angenommenen Menge muss jedoch beachtet werden, dass es sich als sehr schwierig erwies den Rezeptor in gereinigter Form zu erhalten, was vor allem auf seine extreme Labilität während der Aufreinigung zurückzuführen ist (Pike und Haussler 1979). Die Labilität des Rezeptors wäre als eine mögliche Ursache für die oben genannten erniedrigten Resultate anzusehen.

Weitere abweichende Ergebnisse erhielten Nakada et al. (1984) aufgrund von chromatografischen Untersuchungen an Vit D-mangelernährten Hühnern. Hierbei wurde folgende Verteilung der Rezeptorkonzentration festgestellt: Nuklei > Gesamtzellextrakt > Zytosol. Unter physiologischen Bedingungen sollen sich 10 bis 15 % der gesamten Vit D-Rezeptor-Population im gebundenen und somit aktivierten Zustand befinden (Hunziker et al. 1982). Reinhardt et al. (1993) kamen zu einem anderen Ergebnis. Ihre Daten, welche sie mittels Radiorezeptorassay an Rattendarm (Zytosol) erhalten hatten, zeigten, dass die aktivierte Vit D-Rezeptor-Menge im Darm 2-3 % der gesamten Vit D-Rezeptor-Menge nicht übersteigt. In derselben Studie konnte ferner gezeigt werden, dass der gebundene Rezeptor weniger Protease-labil als der ungebundene war. Der inaktivierte (d.h. ligand-freie) Rezeptor befindet sich nach Angaben von Nakada et al. (1984) zum grössten Teil (> 80 %) in der nukleären Fraktion. Die physiologische Signifikanz des zytosolischen Rezeptors ist nach diesen Autoren unbekannt, vorstellbar wäre es aber, dass es sich hierbei um eine degradierte Form des Rezeptors handelt, welche auf dem Weg zur Elimination oder Destruktion ist. Oder aber es handelt sich bei dieser Form des Rezeptors um einen Artefakt, welcher bei der Manipulation während der Präparation des Gewebes entstanden ist (Nakada et al. 1984). Andererseits könnte es sich auch um eine Form des Rezeptors handeln, welcher benötigt wird, um Vit D durch das Zytoplasma zu transportieren. Bei Überlegungen betreffend Vorkommen des zytoplasmatischen Rezeptors sollte auch dem Aspekt der Proteinsynthese Rechnung getragen werden. Die Proteinsynthese findet generell im Zytoplasma statt und somit auch die Vit D-Rezeptor-Synthese. Bei dem vorhandenen zytoplasmatischen Vit D-Rezeptor könnte es sich um die unmittelbar synthetisierte Form

dieses Rezeptors handeln.

Die Ursache dieser sehr unterschiedlichen Resultate betreffend des Vorkommens von Vit D-Rezeptoren im Zytosol könnte darin liegen, dass bei niedrigeren Werten technische Schwierigkeiten beim zytoplasmatischen Nachweis vorlagen. Solche Probleme können während der Fixation durch Maskierung der antigenen Eigenschaften, aber auch aufgrund der charakteristischen Eigenschaften des Antikörpers (Spezifität und Sensitivität) auftreten (Barsony et al. 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls eine zytoplasmatische Anfärbung der Enterozyten beobachtet. Die optisch insgesamt als schwächer eingestufte zytoplasmatische Anfärbung im Dickdarm könnte auf das vermehrte Vorkommen von Becherzellen, welche ein negatives Zytoplasma aufwiesen, zurückzuführen sein. Bei der Ermittlung des immunreaktiven Scores wurden jedoch die zytoplasmatischen Anfärbungen ausser Acht gelassen und nur die Reaktion der Zellkerne der Enterozyten ausgewertet. Die negative Population der Becherzellen wurde für die Ermittlung des IRS nicht berücksichtigt. Damit stellt der hier ermittelte IRS einen enterozytenspezifischen Parameter dar.

Vereinzelt liessen sich Lymphozyten-ähnliche Zellen anfärben, was vor allem in den Peyerschen Platten des Ileums zu beobachten war. Hierbei ist eine spezifische Anfärbung zu vermuten, da Holick (2003) den Vit D-Rezeptor beim Menschen nicht nur in Darm und Knochen, sondern auch in Gehirn, Herz, Magen, Pankreas, Haut, Gonaden und in aktivierten Lymphozyten nachweisen konnte. Bei der Aktivierung dieser Zellen konnte eine starke Zunahme des Gehaltes an Vit D-Rezeptoren aufgezeigt werden (Hausler 1986). Vit D scheint als Immunregulator zu wirken und so präventiv auf autoimmune Erkrankungen Einfluss zu nehmen (Holick 2003). Diese Vermutung erfolgt aufgrund des Nachweises der verzögerten Progression von Arthritis bei Mäusen, welche mit Vit D behandelt wurden (Cantorna et al. 1998). Dieser Aspekt einer Vit D-Wirkung könnte eine mögliche Erklärung dafür sein, weshalb Menschen, welche näher am Äquator leben und infolge erhöhter Sonnenbestrahlung eine erhöhte Vit D-Produktion haben, ein geringeres Risiko aufweisen, an autoimmunen Geschehen zu erkranken (Holick 2003).

Die vorliegende Untersuchung zeigt deutlich, dass das Vorkommen und die Verteilung von Vit D-Rezeptoren signifikante Unterschiede zwischen den Darmabschnitten und bei Milchschaafen ausserdem zwischen den verschiedenen prä-, und postpartalen Zeitpunkten aufweist.

Die Stärke der immunhistochemischen Reaktion der Zellkerne war sowohl bei den Schlachtschaafen als auch bei den Schlachtziegen in den verschiedenen Darmabschnitten signifikant unterschiedlich. Dabei wies bei beiden Tierarten das Duodenum die stärkste Reaktion auf. Dies zeigt eine enge Übereinstimmung mit den Resultaten von Goff et al. (1995), die bei Jersey-Kühen zeigen konnten, dass im Duodenum die stärkste Ca-

Absorption stattfindet. Daraus liesse sich der Schluss ziehen, dass zwischen der Höhe der Ca-Absorption und der Menge an Vit D-Rezeptoren eine positive Korrelation besteht und im Duodenum von Schaf und Ziege, von allen sechs untersuchten Darmabschnitten, die grösste Menge an Ca aktiv absorbiert wird. Da aber im Rahmen der vorliegenden Studie kein Vormagengewebe untersucht wurde, welche gemäss neueren und bereits erwähnten Ergebnissen bei Schaf und Ziege Orte der maximalen Ca-Absorption sind (Schröder et al. 1997), kann diesbezüglich keine endgültige und abgesicherte Aussage gemacht werden. Weiterführende immunhistochemische Untersuchungen an Gewebe von Vormägen und Labmagen könnten diesem Aspekt Rechnung tragen und werden von unserer Arbeitsgruppe gegenwärtig am Rind durchgeführt (Singer, Disseration in Vorbereitung).

Der Faktor Alter erwies sich bei beiden Tierarten als nicht signifikant. Diesbezüglich kamen Goff et al. (1991) zu einem anderen Ergebnis. Sie konnten sowohl bei der Ratte als auch bei der Kuh anhand von an Colonbiopsien durchgeführten Analysen zeigen, dass die Menge Vit D-Rezeptoren im Alter abnimmt. Dies stimmt wiederum mit der Tatsache überein, dass bei älteren Kühen und Ratten die Ca-Absorption erniedrigt ist (Hansard et al. 1954).

Die tendenziell höheren Mittelwerte der Schlachtschafe gegenüber denen von Schlachtziegen ($p > 0.05$) lassen sich folgendermassen erklären: 1. Schafe besitzen mehr Vit D-Rezeptoren im Darm. 2. Die Vit D-Rezeptoren der Schafe werden langsamer als die der Ziegen proteolytisch abgebaut. 3. Die Resultate wurden durch die angewandte immunhistochemische Technik beeinflusst, v. a. durch die tierartspezifische Anbindung von den Antikörpern an das Vit D-Rezeptor-Protein.

Eine Aussage über ein unterschiedliches Vorkommen von bei verschiedenen Rassen der beiden Tierarten konnte in der vorliegenden Untersuchung nicht gemacht werden, weil die Tiere jeweils mehrheitlich einer Rasse angehörten (Saanenziegen, weisses/braunes Alpenschaf). Untersuchungen von Goff et al. (1995) mittels Vit D-Rezeptor-Assays an Colonmukosagewebe von Jersey-Kühen (hohes Hypokalzämierisiko) und Holstein-Kühen (geringeres Hypokalzämierisiko) ergaben, dass bei den Jersey-Kühen signifikant tiefere Werte gegenüber Holstein-Kühen vorhanden waren. Da das Colon beim Wiederkäuer nicht der Ort der maximalen Ca-Absorption ist, ist die Signifikanz einer Veränderung des Gehaltes an in diesem Darmabschnitt nicht ganz klar. Trotzdem wurde aufgrund von Ergebnissen am Rattendarm (Goff et al. 1988) die Hypothese aufgestellt, dass die Menge an unbesetztem Vit D-Rezeptor im Colon die Menge Vit D-Rezeptor im Duodenum reflektiert. Die Menge Vit D-Rezeptor im Colon soll 60-70 % der Menge im Duodenum entsprechen (Goff und Reinhardt 1995). Die geringere Vit D-Rezeptor-Konzentration im Duodenum von Jersey-Kühen gegenüber derjenigen von Holstein-Kühen könnte neben der relativen unterschiedlichen Milchleistung eine mögliche Erklärung für das erhöhte Hypokalzämierisiko der Jerseyrasse darstellen (Goff und Reinhardt 1995), dies aufgrund der Aussage von Goff (2000), dass der Ca-Gehalt in Kolostrum und Milch der Jersey-Kuh zwar höher als derjenige von Holstein-Kühen sei, dies jedoch nicht als der alleinige Grund angesehen werden kann, weshalb

diese Rasse vermehrt an Hypokalzämie erkrankt.

Der Faktor Zeit wies bei den Schafen im Verlaufe der Laktation einen signifikanten Einfluss aus, bei den Ziegen hingegen nicht. In der zweiten Biopsie t2 (1 Wo p.p) waren beim Schaf die tiefsten Werte messbar, danach stiegen die Werte langsam wieder an. Diese Resultate entsprechen den Ergebnissen von Goff et al. (1991), wonach es bei Jersey-Kühen zum Geburtszeitpunkt zu einem signifikanten Abfall (20-30 %) der Vit D-Rezeptor-Menge kommt. Dies könnte ihrer Meinung nach eine mögliche Ursache für das Auftreten von Hypokalzämie sein. In derselben Arbeit ergaben jedoch auch Untersuchungen zum Vit D-Rezeptor-Gehalt an Milchfieber erkrankten und gesunden Jersey-Kühen, dass zwischen diesen beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied im Vit D-Rezeptor-Gehalt bestand. Es waren jedoch Tendenzen zu erkennen, wonach bei erkrankten Tieren der Vit D-Rezeptor-Abfall um die Geburt steiler und der anschliessende Anstieg zu präpartalen Werten langsamer erfolgte. Ob dieser Vit D-Rezeptor-Abfall die Ursache oder die Folge der Hypokalzämie ist, bleibt unklar. Goff et. al. (1991) diskutieren weiterhin die Möglichkeit, dass bei Kühen, welche an Hypokalzämie erkranken, die Vit D-Rezeptoren in ihrer Funktion eingeschränkt sein könnten. Dies würde bedeuten, dass die Vit D-Rezeptoren im Erkrankungsfall das Hormon nur schwach binden dürften (Goff et al. 1991). Als weiteren Aspekt der Entstehung der Hypokalzämie muss an die zum Geburtszeitpunkt stark erhöhten Östrogene gedacht werden. Diese wirken als potente Inhibitoren der Ca-Mobilisation aus dem Knochen. Verschiedene Studien zeigen, dass Kühe mit besonders hohen Östrogenwerten zum Geburtszeitpunkt ein grösseres Risiko tragen, an Hypokalzämie zu erkranken (Goff 2000).

Weshalb bei den Ziegenbiopsien in der vorliegenden Studie kein solcher Vit D-Rezeptor-Abfall um den Geburtszeitpunkt nachzuweisen war, könnte verschiedene Ursachen haben. Möglich wären u.a. zu weit auseinander liegende Biopsieentnahmezeitpunkte, v.a. wenn bedacht wird, dass während den Analysen von Goff et al. (1995) Colonbiopsien innerhalb von zwei Wochen vor und nach der Geburt in dreitägigem Abstand entnommen wurden. Dies würde bedeuten, dass Proben in einem engeren Zeitraum um die Geburt hätten entnommen werden müssen, um den Zeitpunkt mit den tiefsten Vit D-Rezeptor-Mengen erfassen zu können.

Wie bereits im Kap 6.1.2.5 erwähnt, liegen die Summen der Mittelwerte des DD bei der Ziege um den Faktor 3,2 und beim Schaf um den Faktor 2,5 höher als die des CD (Tabelle 9). Es kann davon ausgegangen werden, dass sich bei beiden Tierarten um den entsprechenden Faktor mehr Vit D-Rezeptoren im DD als im CD befinden. Diese Hypothese wird ferner gestützt durch die bei beiden Spezies gefundene, signifikant positive Korrelation der IRS von DD und CD. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Resultate der Biopsien repräsentativ für die entsprechenden Werte im DD sind. Dies untermauert die Ergebnisse von Goff et al. (1988) an Ratte und Kuh (Goff et al. 1995).

8 Ausblick

Weiterführende Untersuchungen sollten zusätzlich Material von Vormägen und Labmagen beinhalten, damit nachgewiesen werden kann, ob der vermutliche Ort der maximalen Ca-Resorption der Lokalisation der grössten Menge an Vit D-Rezeptoren entspricht.

Zudem sollten Analysen an tatsächlich erkrankten Tieren erfolgen, um weitere Aussagen über eine möglicherweise vorhandene Korrelation zwischen dem Zeitpunkt des Auftretens der Hypokalzämie und dem Verlauf der Menge von Vit D-Rezeptoren machen zu können.

Die Bedeutung von speziesspezifischen Unterschieden sowie deren Ursachen und Konsequenzen für die Physiologie und die Pathologie der Hypokalzämie sollten noch genauer untersucht werden, vor allem unter dem Aspekt, dass der Gehalt an Vit D-Rezeptoren nicht der einzig relevante Parameter bei der Ca-Resorption sein dürfte.

Dem Einfluss der unterschiedlichen Nutzungsart (Milchschafrasse versus Fleischrasse) und der Möglichkeit einer daraus resultierenden unterschiedlichen Disposition zu Hypokalzämie sollte in einer weiteren Arbeit Rechnung getragen werden.

9 Literaturverzeichnis

- Allegretto, E. A., Pike, J. W. und Haussler, M. R.**, 1987: Immunochemical detection of unique proteolytic fragments of the chick 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor. Distinct 20-kDa DNA-binding and 45-kDa hormone-binding species. *J Biol Chem* **262**, 1309-1312.
- Allen, W. M. und Sansom, B. F.**, 1986: Parturient paresis (milk fever) and hypocalcemia (cows, ewes, and goats). *Current Veterinary Therapy: food Animal Practice* **2**, 311-317.
- Barsony, J., Renyi, I. und McKoy, W.**, 1997: Subcellular distribution of normal and mutant vitamin D receptors in living cells. Studies with a novel fluorescent ligand. *J Biol Chem* **272**, 5774-5782.
- Behrens, H.**, 2001: Lehrbuch der Schafkrankheiten. 4. Auflage, 491, Parey, Berlin.
- Belkacemi, L., Zuegel, U., Steinmeyer, A., Dion, J. P. und Lafond, J.**, 2005: Calbindin-D28k (CaBP28k) identification and regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in human choriocarcinoma cell line JEG-3. *Mol Cell Endocrinol* **236**, 31-41.
- Blood, D., Radostits, O. und Henderson, J.**, 1983: Veterinary medicine. 6. Auflage, 1877, W.B. Saunders, London.
- Böck, P.**, 1989: Romeis Mikroskopische Technik. 697, Urban und Schwarzenberg, München.
- Boenisch, T.**, 2003: Färbemethoden-Detektionssysteme. In: Boenisch, T. (Hrsg.): Handbuch immunhistochemischer Färbemethoden, 3. Auflage, 34-42, Dako Cytomation, Hamburg.
- Braithwaite, G. D., Glascock, R. F. und Riazuddin, S.**, 1969: Calcium metabolism in lactating ewes. *Br J Nutr* **23**, 827-834.
- Bronner, F.**, 1987: Intestinal calcium absorption: mechanisms and applications. *J Nutr* **117**, 1347-1352.
- Cantorna, M. T., Hayes, C. E. und DeLuca, H. F.**, 1998: 1,25-Dihydroxycholecalciferol inhibits the progression of arthritis in murine models of human arthritis. *J Nutr* **128**, 68-72.
- Carlstrom, G.**, 1970: Studies on parturient paresis in dairy cows. On the composition and calcium binding capacity of two bovine serum protein fractions, with special regard to parturient paresis. *Acta Vet Scand* **11**, 89-102.
- Clemens, T. L., Garrett, K. P., Zhou, X. Y., Pike, J. W., Haussler, M. R. und Dempster, D. W.**, 1988: Immunocytochemical localization of the 1,25-dihydroxyvitamin D receptor in target cells. *Endocrinology* **122**, 1224-1230.
- Cross, H. S., Bareis, P., Hofer, H., Bischof, M. G., Bajna, E., Kriwanek, S., Bonner, E. und Peterlik, M.**, 2001: 25-Hydroxyvitamin D(3)-1alpha-hydroxylase and vitamin D receptor gene expression in human colonic mucosa is elevated during early cancerogenesis. *Steroids* **66**, 287-292.
- Daniel, R. und Moodie, E.**, 1978: The effect of induced hypocalcemia on the cardiac output and blood pressure of dairy cattle. *Res Vet Sci* **24**, 300-382.
- DeLuca, H. F.**, 1979: Vitamin D: Biosynthesis, metabolism and mode of action. In: DeGroot, L. (Hrsg.): Endocrinology, 653-668, Saunders, Philadelphia.
- Ferraris, R. P., Villenas, S. A. und Diamond, J.**, 1992: Regulation of brush-border enzyme activities and enterocyte migration rates in mouse small intestine. *Am J Physiol* **262**, 1047-1059.
- Goff, J. P.**, 2000: Pathophysiology of calcium and phosphorus disorders. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* **16**, 319-337.

- Goff, J. P., Caperna, T. J. und Steele, N. C.**, 1990a: Effects of growth hormone administration on vitamin D metabolism and vitamin D receptors in the pig. *Domest Anim Endocrinol* **7**, 425-433.
- Goff, J. P., Horst, R. L. und Reinhardt, T. A.**, 1988. Duodenum and colon 1,25-dihydroxyvitamin D receptor concentration is increased during lactation in the rat, Seventh Workshop on Vitamin D, Rancho Mirage, California, USA, 246-247.
- Goff, J. P. und Reinhardt, T. A.**, 1995: Breed affects tissue Vitamin D receptor concentration in periparturient Dairy cows: A milk fever risk factor?, 1-13. USDA, Agricultural Research Service, National Animal Disease Center, Ames IA, USA
- Goff, J. P., Reinhardt, T. A., Beckman, M. J. und Horst, R. L.**, 1990b: Contrasting effects of exogenous 1,25-dihydroxyvitamin D [1,25-(OH)₂D] versus endogenous 1,25-(OH)₂D, induced by dietary calcium restriction, on vitamin D receptors. *Endocrinology* **126**, 1031-1035.
- Goff, J. P., Reinhardt, T. A. und Horst, R. L.**, 1991: Enzymes and factors controlling vitamin D metabolism and action in normal and milk fever cows. *J Dairy Sci* **74**, 4022-4032.
- Goff, J. P., Reinhardt, T. A. und Horst, R. L.**, 1995: Milk fever and dietary cation-anion balance effects on concentration of vitamin D receptor in tissue of periparturient dairy cows. *J Dairy Sci* **78**, 2388-2394.
- Gropp, J.**, 1987: Vitamine. In: Scheunert, A. und Trautmann, A. (Hrsg.): Lehrbuch der Veterinärphysiologie, 4. Auflage, 74-78, Parey, Berlin.
- Guss, S.**, 1977: Management and diseases of dairy goats. *Dairy Goat* **3**, 86-88.
- Habicht, A. und Watschinger, B.**, 2001: Parathormon und Kalzium-Phosphat-Stoffwechselstörungen bei chronischer Niereninsuffizienz. *J Minerl Stoffwechs.* **1**, 18-22.
- Haenlein, G. F.**, 1980: Mineral nutrition of goats. *J Dairy Sci* **63**, 1729-1748.
- Hansard, S. L., Comar, C. L. und Davis, G. K.**, 1954: Effects of age upon the physiological behavior of calcium in cattle. *Am J Physiol* **177**, 383-389.
- Haussler, M. R.**, 1986: Vitamin D receptors: nature and function. *Annu Rev Nutr* **6**, 527-562.
- Haussler, M. R., Jurutka, P. W., Hsieh, J. C., Thompson, P. D., Selznick, S. H., Haussler, C. A. und Whitfield, G. K.**, 1995: New understanding of the molecular mechanism of receptor-mediated genomic actions of the vitamin D hormone. *Bone* **17**, 33-38.
- Haussler, M. R. und Norman, A. W.**, 1969: Chromosomal receptor for a vitamin D metabolite. *Proc Natl Acad Sci U S A* **62**, 155-162.
- Hirst, M. und Feldman, D.**, 1986: Cleavage of the rat intestinal 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor by an endogenous protease to a form with defective DNA binding. *Arch Biochem Biophys* **250**, 153-161.
- Holick, M. F.**, 2003: Vitamin D: A millenium perspective. *J Cell Biochem* **88**, 296-307.
- Horst, R. L., Goff, J. P. und Reinhardt, T. A.**, 1989. Age reduces, while pregnancy and lactation increase, instestinal 1,25 dihydroxyvitamin D receptor concentration in the rat and cow. Seventh international conference on production disease in farm animals, New York, USA, 224-227.
- Horst, R. L., Goff, J. P. und Reinhardt, T. A.**, 1994: Calcium and vitamin D metabolism in the dairy cow. *J Dairy Sci* **77**, 1936-1951.
- Horst, R. L., Goff, J. P. und Reinhardt, T. A.**, 1997a: Calcium and vitamin D metabolism during lactation. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **2**, 253-263.

- Horst, R. L., Goff, J. P. und Reinhardt, T. A.**, 2003: Role of vitamin D in calcium homeostasis and its use in prevention of bovine periparturient paresis. *Acta Vet Scand Suppl* 97, 35-50.
- Horst, R. L., Goff, J. P., Reinhardt, T. A. und Buxton, D. R.**, 1997b: Strategies for preventing milk fever in dairy cattle. *J Dairy Sci* 80, 1269-1280.
- Hunziker, W., Walters, M. R., Bishop, J. E. und Norman, A. W.**, 1982: Effect of vitamin D status on the equilibrium between occupied and unoccupied 1,25-dihydroxyvitamin D intestinal receptors in the chick. *J Clin Invest* 69, 826-833.
- Johnson, J., Beckman, M., Pansini-Porta, A., Christakos, S., Bruns, M., Beitz, D., Horst, R. und Reinhardt, T. A.**, 1995: Age and gender effects on 1,25-dihydroxyvitamin D-regulated gene expression. *Exp Gerontol* 30, 631-643.
- Kaune, R.**, 2000: Knochenstoffwechsel. In: von Engelhardt, W. und Breves, G. (Hrsg.): Physiologie der Haustiere, 621-625, Enke, Stuttgart.
- Kessler, J.**, 2004: Milchziegen bedarfsgerecht füttern. *Agroscope Liebefeld-Posieux* 16, 1-4.
- Kohtes, J.**, 1998: Immunhistochemische Untersuchungen zum Vorkommen und zur Verteilung von Steroidhormonrezeptoren in den Fruchthüllen und in der Uteruswand des Rindes. Hannover, Tierärztliche Hochschule, Dissertation, 183.
- Krüdewagen, E. M.**, 1996: Untersuchungen zum Oestrogenrezeptornachweis im Pferdeendometrium - Vergleich verschiedener Methoden. Hannover, Dissertation.
- Liel, Y., Shany, S., Smirnoff, P. und Schwartz, B.**, 1999: Estrogen increases 1,25-dihydroxyvitamin D receptors expression and bioresponse in the rat duodenal mucosa. *Endocrinology* 140, 280-285.
- Liesegang, A., Eicher, R., Sassi, M. L., Risteli, J., Kraenzlin, M., Riond, J. L. und Wanner, M.**, 2000: Biochemical markers of bone formation and resorption around parturition and during lactation in dairy cows with high and low standard milk yields. *J Dairy Sci* 83, 1773-1781.
- Liesegang, A., Risteli, J. und Wanner, M.**, 2005: The effects of first gestation and lactation on bone metabolism in dairy goats and milk sheep. *Bone*.
- Liesegang, A., Sassi, M. L., Risteli, J., Eicher, R., Wanner, M. und Riond, J. L.**, 1998: Comparison of bone resorption markers during hypocalcemia in dairy cows. *J Dairy Sci* 81, 2614-2622.
- Littledike, E. T., Young, J. W. und Beitz, D. C.**, 1981: Common metabolic diseases of cattle: Ketosis, milk fever, grass tetany, and downer cow complex. *J Dairy Sci* 64, 1465-1482.
- Martig, J.**, 2002: Hypokalzämische Gebärlähmung. In: Dirksen, G., Gründer, H. D. und Stöber, M. (Hrsg.): Innere Medizin und Chirurgie des Rindes, 4. Auflage, 1245-1254, Parey, Berlin.
- Matthews, J.**, 1999: Nervous diseases. In: Matthews, J. (Hrsg.): Diseases of the goat, 2. Auflage, 173-174, Blackwell Science, Oxford.
- Milde, P., Merke, J., Ritz, E., Haussler, M. R. und Rauterberg, E. W.**, 1989: Immunohistochemical detection of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptors and estrogen receptors by monoclonal antibodies: comparison of four immunoperoxidase methods. *J Histochem Cytochem* 37, 1609-1617.
- Naito, Y., Goff, J. P., Horst, R. L. und Reinhardt, T. A.**, 1989: Effects of continuous administration of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on plasma minerals and unoccupied colon mucosal 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor concentrations. *J Dairy Sci* 72, 2936-2941.

- Nakada, M., Simpson, R. U. und DeLuca, H. F.**, 1984: Subcellular distribution of DNA-binding and non-DNA-binding 1,25-dihydroxyvitamin D receptors in chicken intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 6711-6713.
- Neibergs, H. L., Bosworth, B. T. und Reinhardt, T. A.**, 1996: Nucleotide sequence of the bovine vitamin D₃ receptor. *J Dairy Sci* **79**, 1313-1315.
- Nelson, D. und Cox, M.**, 2001: Lipide. In: Nelson, D. und Cox, M. (Hrsg.): *Lehninger Biochemie*, 381-410, Springer, Berlin.
- Oberleitner, H.**, 1996: Salz- und Wasserhaushalt. In: Klinke, R. und Silbernagl, S. (Hrsg.): *Lehrbuch der Physiologie*, 331-357, Thieme, Stuttgart.
- Oetzel, G. R.**, 1988: Parturient paresis and hypocalcemia in ruminant livestock. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* **4**, 351-364.
- Pierce, E. A., Dame, M. C. und DeLuca, H. F.**, 1987: Size and Charge of the functional 1,25-dihydroxyvitamin D receptor in porcine intestine. *the journal of biological chemistry* **262**, 17092-17099.
- Pike, J. W., Donaldson, C. A., Marion, S. L. und Haussler, M. R.**, 1982: Development of hybridomas secreting monoclonal antibodies to the chicken intestinal 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 7719-7723.
- Pike, J. W. und Haussler, M. R.**, 1979: Purification of chicken intestinal receptor for 1,25-dihydroxyvitamin D. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 5485-5489.
- Reichrath, J., Friedrich, M., Tilgen, W. und Schmidt, W.**, 2000: Vitamin D und Brustkrebs: Perspektiven für die Entwicklung einer neuen Hormontherapie zur Behandlung von Mammakarzinomen. *magazin forschung* **1**, 64-72.
- Reinhardt, T. A., Horst, R. L. und Goff, J. P.**, 1993: 1,25-Dihydroxyvitamin D receptor occupancy is limited: dissociation of occupied receptor levels from plasma 1,25-dihydroxyvitamin D levels. *Endocrine Journal* **1**, 317-322.
- Rüsch, P. und Rusch, J.**, 1996. Untersuchungen bei Kühen mit Milchfieber. Schweizerische Tierärztagung, Biel GST, 1-3.
- Sandgren, M. E., Bronnegard, M. und DeLuca, H. F.**, 1991: Tissue distribution of the 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor in the male rat. *Biochem Biophys Res Commun* **181**, 611-616.
- Scheidt, K.**, 2004: Kurz- und mittelfristige Effekte der intermittierenden Applikation von humanem Parathormon (hPTH) auf den Calcium-, Phosphor- und Knochenstoffwechsel beim Pferd. Hannover, Tierärztliche Hochschule, Dissertation, 250.
- Schröder, B., Pfeffer, E., Failing, K. und Breves, G.**, 1995: Binding properties of goat intestinal vitamin D receptors as affected by dietary calcium and/or phosphorus depletion. *Zentralbl Veterinarmed A* **42**, 411-417.
- Schröder, B., Rittmann, I., Pfeffer, E. und Breves, G.**, 1997: In vitro studies on calcium absorption from the gastrointestinal tract in small ruminants. *J Comp Physiol [B]* **167**, 43-51.
- Syedmehtdi, M., Heath, A. M. und Pugh, D. G.**, 2002: Feeding and nutrition. In: Pugh, D. G. (Hrsg.): *Sheep and Goat Medicine*, 19-60, Saunders, Philadelphia.
- Shi, S. R., Key, M. E. und Kalra, K. L.**, 1991: Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* **39**, 741-748.
- Sykes, A. und Russel, A.**, 2000: Deficiency of mineral macro-elements. In: Aitken, I. D. und Martin, W. B. (Hrsg.): *Diseases of sheep*, 3. Auflage, 323-324, Blackwell, Oxford.

- Tagari, H. und Brock, E.**, 1991: Effects of various dietary cation-anion balances on response of experimentally induced hypocalcaemia in sheep. *Journal of Dairy Science* **74**, 4215-4224.
- Thomas, M. G., Sylvester, P. A., Newcomb, P. und Longman, R. J.**, 1999: Vitamin D receptor expression in colorectal cancer. *J Clin Pathol* **52**, 181-183.
- Vollmerhaus, B. und Roos, H.**, 1999: Speiseröhre, Magen, Darm, Darmanhangsdrüsen. In: Nickel, R., Schummer, A. und Seiferle, E. (Hrsg.): Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, 8. Auflage, 103-213, Parey Verlag, Berlin.
- Walbert, T., Jirikowski, G. F. und Prufer, K.**, 2001: Distribution of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor immunoreactivity in the limbic system of the rat. *Horm Metab Res* **33**, 525-531.
- Wiese, R. J., Uhland-Smith, A., Ross, T. K., Prah, J. M. und DeLuca, H. F.**, 1992: Up-regulation of the vitamin D receptor in response to 1,25-dihydroxyvitamin D₃ results from ligand-induced stabilization. *J Biol Chem* **267**, 2082-2086.
- Zineb, R., Zhor, B., Odile, W. und Marthe, R. R.**, 1998: Distinct, tissue-specific regulation of vitamin D receptor in the intestine, kidney, and skin by dietary calcium and vitamin D. *Endocrinology* **139**, 1844-1852.

10 Anhang

Tabelle 12: Färbeprotokoll VDR-Nachweis.

	Zeit	Arbeitsgang
1.	10 min 10 min 10 min 3 min 3 min 3 min 3 min	Xylol I Xylol II Isopropanolol 96%igen Alkohol 80%igen Alkohol 70%igen Alkohol 50%igen Alkohol
2.	2 min	spülen in TBS Puffer
3.	10 min	in Citratpuffer in einem abgedeckten Kunststoffgefäß bei 600 W aufheizen und dann 3*5 min kochen
4.	20 min	in Citratpuffer (RT) abkühlen
5.	10 min	in 3%igem H ₂ O ₂
6.	5 min	in ein frisches TBS-Bad stellen
7.	20 min	Inkubation mit Avidin D-Blockierungslösung (Blocking Kit, Vector Laboratories, SP-2001)
8.	kurz	mit TBS-Puffer abspülen
9.	20 min	Inkubation mit Biotin-Blockierungslösung (Blocking Kit, Vector Laboratories, SP-2001)
10.	kurz	spülen mit TBS
11.	10 min	Inkubation mit Protein-Block Serum-free (Dako)
12.	kurz	spülen mit TBS
13.	80 min	Inkubation mit biotinmarkiertem Antikörper 9A7γ
14.	5 min	abspülen mit TBS
15.	30 min	inkubieren mit StreptABComplex/HRP (DakoCytomation StreptABComplex/HRP K0377)
16.	5 min	spülen in TBS-Puffer
17.	3 min	Gebrauchslösung DAB
18.	5 min	in frisches TBS-Pufferbad stellen
19.	3 min	Kernfärbung mit Hämalaun nach Mayer
20.	10 min	Bläuen unter fließendem Wasser aufsteigende Alkoholreihe und Eindecken mit Pertex®

Tabelle 13: Verzeichnis der in die Untersuchung eingegangenen Schafe.

Tier	Darmabschnitt	Probenummer	Alter	Rasse
Schaf 1	Duodeum descendens	447/04	2 3/4 J	Weisses Alpenschaf
	Duodenum ascendens	448/04		
	Jejunum	449/04		
	Ileum	450/04		
	Cäkum	451/04		
	Colon descendens	452/04		
Schaf 2	Duodeum descendens	453/04	5 J	Braunes Alpenschaf
	Duodenum ascendens	454/04		
	Jejunum	455/04		
	Ileum	456/04		
	Cäkum	457/04		
	Colon descendens	458/04		
Schaf 3	Duodeum descendens	459/04	5 J	Weisses Alpenschaf
	Duodenum ascendens	460/04		
	Jejunum	461/04		
	Ileum	462/04		
	Cäkum	463/04		
	Colon descendens	464/04		
Schaf 4	Duodeum descendens	503/03	3 J	Wall.Schwarznasenschaf
	Duodenum ascendens	506/03		
	Jejunum	505/03		
	Ileum	504/03		
	Cäkum	501/03		
	Colon descendens	502/03		
Schaf 5	Duodeum descendens	509/03	1 J	Weisses Alpenschaf
	Duodenum ascendens	512/03		
	Jejunum	511/03		
	Ileum	510/03		
	Cäkum	507/03		
	Colon descendens	508/03		

Tabelle 13: Fortsetzung.

Tier	Darmabschnitt	Probennummer	Alter	Rasse
Schaflamm 1	Duodenum descendens	1075/03	6 Mte	Braunes Alpenschaf
	Duodenum ascendens	1076/03		
	Jejunum	1077/03		
	Ileum	1078/03		
	Cäkum	1080/03		
	Colon descendens	1079/03		
Schaflamm 2	Duodenum descendens	1081/03	6 Mte	Braunes Alpenschaf
	Duodenum ascendens	1082/03		
	Jejunum	1083/03		
	Ileum	1084/03		
	Cäkum	1086/03		
	Colon descendens	1085/03		
Schaflamm 3	Duodenum descendens	1087/03	6 Mte	Braunes Alpenschaf
	Duodenum ascendens	1088/03		
	Jejunum	1089/03		
	Ileum	1090/03		
	Cäkum	1092/03		
	Colon descendens	1091/03		
Schaflamm 4	Duodenum descendens	1093/03	6 Mte	Braunes Alpenschaf
	Duodenum ascendens	1094/03		
	Jejunum	1095/03		
	Ileum	1096/03		
	Cäkum	1098/03		
	Colon descendens	1097/03		
Schaflamm 5	Duodenum descendens	1099/03	6 Mte	Braunes Alpenschaf
	Duodenum ascendens	1100/03		
	Jejunum	1101/03		
	Ileum	1102/03		
	Cäkum	1104/03		
	Colon descendens	1103/03		

Tabelle 14: Verzeichnis der in die Untersuchung eingegangenen Ziegen.

Tier	Darmabschnitt	Probennummer	Alter	Rasse
Ziege 1	Duodenum descendens	627/03	6 J	Saanenziege
	Duodenum ascendens	626/03		
	Jejunum	623/03		
	Ileum	624/03		
	Cäkum	628/03		
	Colon descendens	625/03		
Ziege 2	Duodenum descendens	883/04	3 J	Saanenziege
	Duodenum ascendens	884/04		
	Jejunum	885/04		
	Ileum	886/04		
	Cäkum	887/04		
	Colon descendens	888/04		
Ziege 3	Duodenum descendens	864/03	6 J	Saanenziege
	Duodenum ascendens	858/03		
	Jejunum	862/03		
	Ileum	868/03		
	Cäkum	861/03		
	Colon descendens	866/03		
Ziege 4	Duodenum descendens	225/04	1 1/2 J	?
	Duodenum ascendens	222/04		
	Jejunum	226/04		
	Ileum	221/04		
	Cäkum	223/04		
	Colon descendens	224/04		
Ziege 5	Duodenum descendens	227/04	1 1/2 J	?
	Duodenum ascendens	228/04		
	Jejunum	229/04		
	Ileum	230/04		
	Cäkum	231/04		
	Colon descendens	232/04		

Tabelle 14: Fortsetzung.

Tier	Darmabschnitt	Probennummer	Alter	Rasse
Ziegenlamm 1	Duodenum descendens	878/03	10 Wo	Saanenziege
	Duodenum ascendens	877/03		
	Jejunum	881/03		
	Ileum	880/03		
	Cäkum	879/03		
	Colon descendens	876/03		
Ziegenlamm 2	Duodenum descendens	884/03	10 Wo	Saanenziege
	Duodenum ascendens	883/03		
	Jejunum	887/03		
	Ileum	886/03		
	Cäkum	885/03		
	Colon descendens	882/03		
Ziegenlamm 3	Duodenum descendens	890/03	10 Wo	Saanenziege
	Duodenum ascendens	889/03		
	Jejunum	893/03		
	Ileum	892/03		
	Cäkum	891/03		
	Colon descendens	888/03		
Ziegenlamm 4	Duodenum descendens	896/03	10 Wo	Saanenziege
	Duodenum ascendens	895/03		
	Jejunum	899/03		
	Ileum	898/03		
	Cäkum	897/03		
	Colon descendens	894/03		
Ziegenlamm 5	Duodenum descendens	902/03	10 Wo	Saanenziege
	Duodenum ascendens	901/03		
	Jejunum	905/03		
	Ileum	904/03		
	Cäkum	903/03		
	Colon descendens	900/03		

Tabelle 15: Mittelwerte und Standardfehler des VDR-IRS der Schlachtschafe.
 DD = Duodenum descendens, DA = Duodenum ascendens, JE = Jejunum, IL = Ileum, CC = Cäkum, CD = Colon descendens, BG = basale Drüsenabschnitte, IG = intermediäre Drüsenabschnitte, SG = oberflächliche Drüsenabschnitte, SE = Oberflächenepithel.

Adulte Schafe

Lokalisation	Stellen	Mittelwert	Standardfehler
DD	BG	1495,4	247,54
	IG	982,25	107,08
	SG	317,95	53,84
	SE	229,15	74,39
DA	BG	1300,45	136,88
	IG	707,05	106,17
	SG	270,95	72,35
	SE	185,1	57,62
JE	BG	852,9	103,22
	IG	580,3	48,28
	SG	211,35	58,88
	SE	154,45	49,57
IL	BG	261,25	77,47
	IG	289,7	104,33
	SG	275,4	107,14
	SE	214,6	106,41
CC	BG	193,8	127,71
	IG	291,7	85,26
	SG	297,3	79,12
	SE	169,95	117,83
CD	BG	261,95	74,27
	IG	471,05	111,59
	SG	272,65	116,94
	SE	212,8	78,23

Tabelle 15: Fortsetzung.**Junge Schafe**

Lokalisation	Stellen	Mittelwert	Standardfehler
DD	BG	1227,65	168,57
	IG	1048,15	236,45
	SG	491,85	211,74
	SE	316,25	136,54
DA	BG	1242,05	185,64
	IG	927,4	191,56
	SG	430,3	196,1
	SE	339,75	130,72
JE	BG	594,25	164,97
	IG	409,5	141,57
	SG	301,85	136,65
	SE	210,85	85,99
IL	BG	589,95	281,55
	IG	244,6	72,97
	SG	197	72,98
	SE	168,45	63,87
CC	BG	161,65	36,63
	IG	396,8	128,89
	SG	457,5	203,27
	SE	195,45	70,58
CD	BG	288,4	64,93
	IG	493,6	140,92
	SG	254,8	59,76
	SE	136,15	28,43

Tabelle 16: Mittelwerte und Standardfehler des VDR-IRS der Schlachtziegen.
 DD = Duodenum descendens, DA = Duodenum ascendens, JE = Jejunum, IL = Ileum, CC = Cäkum, CD = Colon descendens, BG = basale Drüsenabschnitte, IG = intermediäre Drüsenabschnitte, SG = oberflächliche Drüsenabschnitte, SE = Oberflächenepithel.

Adulte Ziege

Lokalisation	Stellen	Mittelwert	Standardfehler
DD	BG	1030,6	162,4
	IG	831,2	156,22
	SG	341,8	95,61
	SE	136,8	26,31
DA	BG	893	176,54
	IG	633,6	143,14
	SG	254,6	61,53
	SE	104	10,63
JE	BG	495,6	122,37
	IG	425,2	132,63
	SG	189,8	37,15
	SE	90,6	9,79
IL	BG	144	18,91
	IG	146,2	23,39
	SG	110,8	12,37
	SE	81,2	4,1
CC	BG	206,8	81,54
	IG	306,8	114,31
	SG	210,4	77,96
	SE	98,2	7,69
CD	BG	172,4	23,02
	IG	384,6	127,98
	SG	237,6	61,29
	SE	96,2	8,37

Tabelle 16: Fortsetzung.**Junge Ziege**

Lokalisation	Stellen	Mittelwert	Standardfehler
DD	BG	1162,8	59,17
	IG	923,4	93,1
	SG	211,6	38,14
	SE	98,8	3,39
DA	BG	1018	76,53
	IG	911,6	94,94
	SG	167,4	17,64
	SE	94,4	2,63
JE	BG	664,4	99,04
	IG	458,4	53,35
	SG	206	22,64
	SE	88,2	2,39
IL	BG	133,4	5,78
	IG	154,4	16,91
	SG	118,8	6,68
	SE	96	4,46
CC	BG	112	7,16
	IG	142,6	15,56
	SG	114	10,45
	SE	95,8	2,92
CD	BG	151,2	19,11
	IG	192	4,21
	SG	127,4	7,68
	SE	85,6	3,18

Tabelle 17: Mittelwerte und Standardfehler des VDR-IRS der Kolonbiopsien bei 11 adulten Schafen.

BG = basale Drüsenabschnitte, IG = intermediäre Drüsenabschnitte, SG = oberflächliche Drüsenabschnitte, SE = Oberflächenepithel.

Schafe

Biopsieentnahme	Stellen	Mittelwert	Standardfehler
t1	BG	120,63	8,43
	IG	177,27	21,87
	SG	205,36	19,32
	SE	126,9	10,84
t2	BG	104,63	6,08
	IG	122,45	8,02
	SG	151,63	9,65
	SE	114,18	7,21
t3	BG	126,36	9,72
	IG	164,63	14,99
	SG	172,09	22,47
	SE	128,18	9,28
t4	BG	149,45	14,18
	IG	197	16,27
	SG	230,45	20,17
	SE	138,72	7,26
t5	BG	186,81	17,96
	IG	283,9	35,54
	SG	297,45	22,03
	SE	138	5,95
t6	BG	181	21,45
	IG	305,09	33,05
	SG	272,9	25,01
	SE	130,18	6,15
t7	BG	240,18	29,19
	IG	307,09	24,71
	SG	299,09	23,02
	SE	140,9	11,34

Tabelle 18: Mittelwerte und Standardfehler des VDR-IRS der Kolonbiopsien bei 11 adulten Ziegen.
 BG = basale Drüsenabschnitte, IG = intermediäre Drüsenabschnitte, SG = oberflächliche Drüsenabschnitte, SE = Oberflächenepithel.

Ziegen

Biopsieentnahme	Stellen	Mittelwert	Standardfehler
t1	BG	232	15,36
	IG	336,63	15,4
	SG	355,54	38,35
	SE	165,36	6,62
t2	BG	271,81	21,65
	IG	382,18	18,26
	SG	334,36	13,29
	SE	174,54	7,81
t3	BG	234,9	18,04
	IG	332,36	13,28
	SG	344,18	26,34
	SE	184,63	9,07
t4	BG	238,9	19,95
	IG	359,54	21,15
	SG	372,54	29,81
	SE	168,54	8,01
t5	BG	256,45	29,04
	IG	410,63	40,33
	SG	380,63	41,74
	SE	171,63	5,85
t6	BG	261,36	20,3
	IG	422,9	33,07
	SG	422,09	37,96
	SE	191,9	7,82
t7	BG	280,9	20,22
	IG	402,18	20,48
	SG	402,27	21,52
	SE	184,18	7,31

11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bedanken bei allen Personen, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben, insbesondere bei:

Herrn Prof. Dr. A. Boos für die Überlassung des Themas, für die wissenschaftliche und gute Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Dr. M. Wanner für die Übernahme des Korreferates.

Frau Dr. A. Liesegang für die grosszügige Unterstützung im Verlaufe dieser Arbeit.

Frau J. Leclerc für die wertvolle fachliche Unterstützung bei der Durchführung der immunhistologischen Analysen sowie für die gute Zusammenarbeit im Labor.

Meinen Mitdoktoranden D. Wehbrink, M. Schäubli und M. Oswald für die tolle Kameradschaft und die gute Stimmung im Labor und Büro.

Meinen Eltern für das Ermöglichen meines Berufes und die tolle Unterstützung während des Studiums.

Jean-Pierre für seine technische und moralische Unterstützung. Ohne ihn wäre diese Arbeit vermutlich nie zu einem Ende gekommen.

Lebenslauf

Katharina Riner, geboren am 27.3.1976, von Dulliken SO und Herznach AG

1983-1989	Primarschule Dulliken SO
1989-1997	Gymnasium Kantonsschule Hardwald, Olten SO
1997-2003	Studium der Veterinärmedizin Universität Zürich
2003-2006	Doktorandin am Institut für Tierernährung und am Veterinär- Anatomischen Institut der Vetsuisse Fakultät der Universität Zürich
2004-2006	Assistentin in der Kleintierklinik am Sonnenberg, Möhlin AG